

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Scienze Farmacologiche e Tossicologiche, dello Sviluppo e  
del Movimento Umano**

**Ciclo XVIII**

**Settore Concorsuale di afferenza: 05/H1**

**Settore Scientifico disciplinare: BIO 16**

**TITOLO TESI**

**Scaffold funzionali per il differenziamento condrogenico di  
cellule staminali mesenchimali umane**

**Presentata da: Dott. Stefano Focaroli**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Prof.ssa Patrizia Hrelia**

**Prof.ssa Mirella Falconi**

**Esame finale anno 2016**

# INDICE

INTRODUZIONE.....	pag. 6
1. Cellule utilizzate nel tissue engineering.....	8
1.1. Cellule staminali.....	9
<i>Cellule staminali embrionali.....</i>	<i>10</i>
<i>Cellule staminali ottenute da trasferimento nucleare di cellule somatiche.....</i>	<i>11</i>
<i>Riprogrammazione e cellule staminali pluripotente indotte (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs).....</i>	<i>12</i>
<i>Cellule staminali adulte e cellule staminali mesenchimali.....</i>	<i>13</i>
<i>MSC da tessuto adiposo (Adipose Derived Stem Cells, ADSCs).....</i>	<i>16</i>
2. Scaffold e Biomateriali.....	19
2.1. Materiali naturali.....	22
2.2. Materiali sintetici.....	24
2.3. Materiali ceramici.....	25
3. Stimoli chimici e fisici.....	26
4. Cartilagine Articolare.....	29
4.1. Struttura e patologie della cartilagine articolare.....	29

<b>4.2. TE per il trattamento di danni alla cartilagine articolare.....</b>	<b>30</b>
<i>Terapia cellulare .....</i>	<b>31</b>
<i>Scaffold e biomateriali.....</i>	<b>32</b>
<i>Fattori di crescita.....</i>	<b>33</b>
<i>Cartilagine ingegnerizzata.....</i>	<b>35</b>
<b>SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>38</b>
<b>5. Valutazione dell' efficienza di differenziamento in senso condrogenico di ADSC seminate su uno scaffold di gelatina /genipina.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1. Semina e coltura delle ADSCs.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2. Scaffold di gelatina /genipina.....</b>	<b>38</b>
<b>5.3. Semina delle ADSC negli scaffold di gelatina/genipina.....</b>	<b>38</b>
<b>5.4. Saggio di vitalità.....</b>	<b>39</b>
<b>5.5. Differenziamento condrogenico.....</b>	<b>39</b>
<b>5.6. Analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM).....</b>	<b>39</b>
<b>5.7. qRT-PCR (Quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction).....</b>	<b>40</b>
<b>5.8. Analisi statistica.....</b>	<b>40</b>

<b>6. Incapsulazione di ADSCs in particelle di alginato gelificato tramite ioni Ca/Co come potenziale scaffold funzionale per il differenziamento condrogenico.....</b>	<b>41</b>
<b>6.1. Semina e coltura delle ADSCs.....</b>	<b>41</b>
<b>6.2. Soluzione di alginato ed incapsulazione cellulare.....</b>	<b>41</b>
<b>6.3. Vitalità cellulare ed analisi istologica.....</b>	<b>42</b>
<b>6.4. qRT-PCR (Quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction).....</b>	<b>42</b>
<b>6.5. Analisi statistica.....</b>	<b>43</b>
<b>7. Produzione di sistemi microfluidici “low cost” utilizzabili per la produzione di scaffold microparticellari.....</b>	<b>43</b>
<b>7.1. Produzione di template tramite microlavorazione.....</b>	<b>43</b>
<b>7.2. Fabbricazione dei microchip.....</b>	<b>44</b>
<b>7.3. Validazione dei microchip: produzione di microparticlelle di cellulosa Acetato.....</b>	<b>45</b>
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>46</b>
<b>8. Valutazione dell’ efficienza di differenziamento in senso condrogenico di ADSC seminate su uno scaffold di gelatina /genepina.....</b>	<b>46</b>
<b>9. Incapsulazione di ADSCs in particelle di alginato gelificato tramite ioni Ca/Co come potenziale scaffold funzionale per il differenziamento condrogenico.....</b>	<b>54</b>

10. Produzione di sistemi microfluidici “ <i>low cost</i> ” utilizzabili per la produzione di scaffold microparticellari.....	65
CONCLUSIONE.....	74
REFERENZE.....	76

# INTRODUZIONE

Sebbene il concetto di ingegneria tissutale (*tissue engineering*, TE) possa sembrare relativamente recente, l'idea di sostituire un tessuto compromesso fu proposta per la prima volta durante il XVI secolo da Gaspare Tagliacozzi (1546-99), professore di Anatomia e Chirurgia dell'Università di Bologna, il quale escogitò un metodo per la ricostruzione del naso nei mutilati del volto tramite l'utilizzo di un lembo di cute prelevato dall'avambraccio del paziente. Tagliacozzi descrive il metodo in dettaglio nel suo trattato "*De curtorum chirurgia per insitionem*" (Chirurgia delle mutilazioni per mezzo di innesti) pubblicato a Venezia nel 1597<sup>1, 2</sup> (figura I.1). Secoli più tardi, il TE fu definito come "l'applicazione dei principi e dei metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita per comprendere a fondo la relazione che esiste tra struttura e funzione nei tessuti viventi normali e patologici, per lo sviluppo di sostituti biologici che possano ripristinare, mantenere e migliorare la funzione tissutale". Questo concetto nasce durante il 1st Tissue Engineering Symposium, tenutosi nel 1988<sup>3, 4</sup> e, dall'inizio del secolo, l'impatto che ha avuto nella comunità scientifica ha assunto un rilevanza tale che, ad oggi, è virtualmente possibile la rigenerazione di quasi tutti i tessuti dell'organismo umano<sup>5-10</sup>. Attualmente, la definizione accettata a livello globale è quella descritta dall'US National Institutes of Health: "La medicina rigenerativa/ingegneria tissutale è un campo multidisciplinare in rapida crescita che si avvale delle scienze fisiche, ingegneristiche e della vita per sviluppare ed ottenere cellule funzionali, tessuti ed organi per riparare, sostituire o migliorare le funzioni biologiche perse a causa di anomalie congenite, traumi, malattie o invecchiamento"<sup>11</sup>.

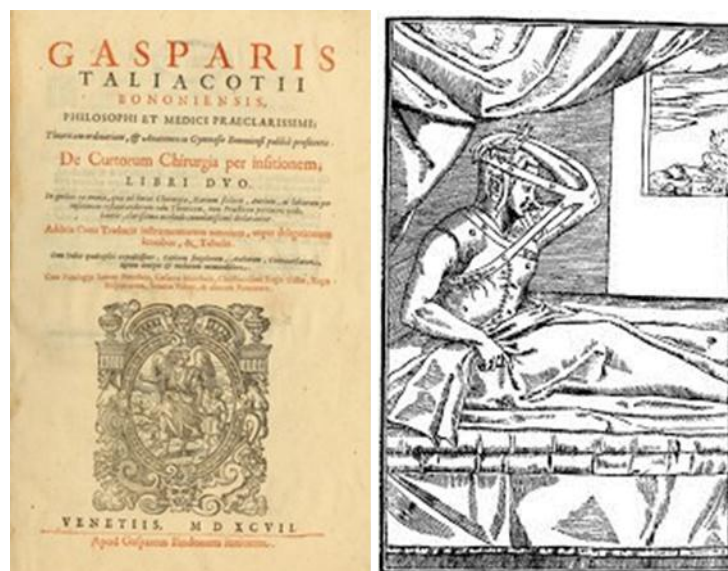


Figura I.1. Frontespizio (sinistra) e un'immagine tratta dal trattato “*De curtorum chirurgia per insitionem*” di Gaspere Tagliacozzi

Pur non discostandosi in maniera sostanziale dalla definizione originale, quest'ultima pone maggiormente risalto alla multidisciplinarietà ed introduce anche il concetto di medicina rigenerativa (MR) la quale, pur condividendo lo scopo finale del TE, pone maggiormente l'attenzione sulla terapia cellulare (in realtà i due termini vengono usati come sinonimi da alcuni autori mentre per altri il TE è considerato soltanto una branca della RM, tuttavia la distinzione concettuale è da considerarsi arbitraria)<sup>12,13</sup>. Come già accennato, la trasversalità dell' ingegneria tissutale coinvolge discipline quali medicina clinica, ingegneria meccanica, scienze dei materiali, genetica ed, in generale, scienze fisiche e della vita; questa multidisciplinarietà si rende necessaria considerando le tre componenti fondamentali di cui si avvale il TE, ovvero: 1) cellule, 2) materiali naturali o artificiali di supporto (scaffold), 3) stimoli chimici o meccanici specifici del tessuto da trattare<sup>1,10,14,15</sup>. Il coinvolgimento di tali componenti avviene, di solito, in maniera sequenziale e può essere riassunto nei seguenti punti:

1. Raccolta di una porzione di tessuto dal paziente tramite biopsia.

2. Isolamento delle cellule dal tessuto e loro coltivazione in terreno sterile.
3. Proliferazione delle cellule isolate in fiasca.
4. Semina delle cellule su un supporto (scaffold) in condizioni sterili.
5. Aggiunta di fattori di crescita (stimolo chimico) o utilizzo di bioreattori (stimolo meccanico) per lo sviluppo del tessuto di neoformazione.
6. Impianto del tessuto riprodotto *in vitro* nell'organismo per la riparazione/neoformazione di tessuti o organi danneggiati.

Da notare che le fasi appena descritte non fanno parte di un protocollo immutabile, ad esempio le cellule possono essere ottenute da un individuo diverso dal paziente da trattare (cellule allogeniche) <sup>16,17</sup> oppure le stesse cellule possono essere impiantate direttamente nel tessuto danneggiato senza utilizzare matrici solide <sup>18, 19,20, 21</sup> o, ancora, possono essere utilizzati scaffold non contenenti cellule ma che promuovono la colonizzazione cellulare *in vivo* <sup>22-24</sup>.

## **1. Cellule utilizzate nel tissue engineering**

Lo sviluppo del TE negli anni è andato di pari passo con la comprensione sempre più approfondita dei meccanismi cellulari che sono alla base della rigenerazione tissutale. Come precedentemente descritto, le prime fasi riguardano la raccolta di una porzione di tessuto ed il conseguente isolamento delle cellule seguito dalla loro espansione in coltura. Il tessuto donatore può essere eterologo (derivante da una specie differente), allogenico (stessa specie, individui differenti) oppure autologo; naturalmente, l'utilizzo di cellule autologhe è preferibile a causa delle problematiche legate al rigetto di strutture *non-self* da parte dell'ospite e, di conseguenza, permette di evitare la somministrazione di farmaci immunosoppressivi a cui sono spesso associati



severi effetti collaterali <sup>10, 15</sup>. Inizialmente, la strategia più utilizzata era basata sull'uso cellule autologhe derivanti direttamente dal tessuto da trattare; se da un lato questo approccio permette di sfruttare cellule native, e quindi già differenziate, dall'altro, varie problematiche ne ostacolano l'utilizzo; per esempio, la capacità di proliferazione *in vitro* è garantita soltanto per periodi relativamente brevi (infatti con il tempo si nota una progressiva perdita di funzionalità organo-specifica), le cellule di alcuni distretti non sono in grado di espandersi (pancreas) ed una compromissione severa del tessuto/organo da trattare non garantisce di ottenere biopsie aventi un numero abbastanza elevato di cellule sane<sup>25</sup>. Tali limitazioni hanno fatto sì l'attenzione si sia focalizzata sull' utilizzo di cellule staminali dalle quali è possibile ottenere strutture tessuto-specifiche della maggior parte delle strutture dell'organismo<sup>26-28</sup>.

### **1.1. Cellule staminali**

Ancora non esiste una definizione universalmente valida di cellula staminale: attualmente, la descrizione più accreditata nel mondo scientifico pone le staminali come cellule indifferenziate altamente proliferanti che hanno la capacità di produrre altre cellule staminali e progenie specializzata <sup>29, 30</sup>. La capacità di differenziarsi in varie linee cellulari rappresenta la potenza; una cellula che può differenziarsi in tutti i tessuti dell'organismo e nei tessuti extraembrionali è definita totipotente, l'esempio classico è rappresentato dallo zigote. Le cellule pluripotenti derivano dalle totipotenti e possono differenziarsi nei tre strati germinali che costituiscono la matrice embrionale di tutte le cellule del corpo mentre le multipotenti sono cellule che possono dare origine a tessuti derivanti dai rispettivi foglietti germinativi. In questa classificazione abbiamo

anche le cellule unipotenti presenti nei tessuti adulti, potenzialmente più limitate nonché organo-specifiche, le quali sono in grado di auto-rinnovarsi e di differenziare nel tipo cellulare del tessuto di appartenenza, assicurandone la riparazione ed il mantenimento<sup>31, 32</sup>.

### ***Cellule staminali embrionali***

Le cellule staminali embrionali (Embryonic stem cells, ESCs) si formano appena dopo il concepimento e per i primi 1-3 giorni sono totipotenti, tuttavia, dopo tale periodo, perdono la capacità di formare i così detti annessi embrionali il che le colloca fra le cellule pluripotenti<sup>31,33</sup>. Il loro isolamento è ottenuto tramite aspirazione della massa cellulare interna dell'embrione durante lo stato di blastocisti (5 giorni dopo la fecondazione) e vengono coltivate in presenza di fibroblasti e diversi fattori di crescita<sup>25, 34</sup>. In queste condizioni possono essere mantenute *in vitro* in uno stato indifferenziato per almeno 80 passaggi mantenendo la capacità di differenziarsi in quasi tutti i tipi di cellule se opportunamente stimolate<sup>35-37</sup>. Questa è una caratteristica particolarmente interessante nell'ambito di eventuali sviluppi terapeutici e, come documentato nella letteratura scientifica, esistono numerosi esempi di differenziamento delle ESCs in cheratinociti e neuroni (caratteristiche di una differenziazione ectodermica)<sup>38-40</sup>, cellule cardiache, del sangue, endoteliali, muscolari e cartilaginee (peculiari di un differenziamento mesodermico)<sup>41-43</sup> e cellule pancreatiche (che indica la capacità di differenziamento endodermico)<sup>44</sup>. La pluripotenza è confermata anche dalla capacità di formare in coltura i cosiddetti corpi embrionali, ovvero aggregati cellulari in cui sono ben distinguibili i tre foglietti embrionali, nonché dal fatto che possono sviluppare teratomi benigni una volta impiantate in blastocisti ospiti<sup>45</sup>. Tuttavia, il loro utilizzo terapeutico

rimane ancora limitato a causa della loro alta capacità proliferativa, che provoca lo sviluppo di tumori una volta impiantate in un organismo, e dalla possibilità di differenziarsi in tipi cellulari non desiderati<sup>19, 46</sup>. Un altro problema risiede anche nel fatto che, per motivi etici, l'utilizzo delle ESCs umane è limitato o addirittura proibito in alcuni paesi<sup>20, 47, 48</sup> in quanto alcune comunità condannano la distruzione dell'embrione necessaria per ottenere le cellule.

### ***Cellule staminali ottenute da trasferimento nucleare di cellule somatiche***

Le cellule staminali possono essere ottenute anche tramite procedure di clonaggio. Questa tecnica ha riscontrato un forte interesse dalla nascita della pecora Dolly nel 1997<sup>49</sup>. Infatti Dolly fu il primo mammifero clonato ottenuto tramite il trasferimento nucleare da una cellula somatica adulta ad una cellula uovo non fecondata che è stata successivamente impiantata. Da questo studio hanno fatto seguito una serie di esperimenti che hanno portato alla clonazione di altre specie come bovini<sup>50</sup>, capre<sup>51</sup>, topi<sup>52</sup> e maiali<sup>53</sup>. La potenzialità di questa tecnica ha fatto sì che negli anni a seguire il trasferimento nucleare sia stato uno degli argomenti più studiati anche in relazioni al suo possibile impiego nel TE. Questo ha portato alla definizione di due tipi di clonaggio: il clonaggio riproduttivo ed il clonaggio terapeutico<sup>25</sup>. Il clonaggio riproduttivo, il cui studio sulla specie umana è proibito in molti paesi, è usato per generare un embrione avente lo stesso materiale genetico della cellula donatrice con lo scopo di essere impiantato nell'utero in modo da ottenere un neonato clone del suo donatore. Il clonaggio terapeutico permette di produrre linee di ESCs con un corredo genetico identico a quello di donatore ma ha lo scopo di produrre cellule staminali pluripotenti autologhe da utilizzare come terapia ogni volta che si necessiti di una riparazione o sostituzione di un organo o tessuto<sup>54</sup>.

Naturalmente, oltre alla possibilità, in linea teorica, di disporre di tutti i tessuti, questo approccio è utile per non permettere l'innescò di una risposta immunitaria da rigetto tipica del trapianto di cellule allogeniche<sup>25</sup>.

Pur essendo una strada promettente, l'impiego clinico del clonaggio terapeutico è ancora nella sua fase primordiale e ulteriori studi sono necessari prima che questa tecnica possa essere applicata su larga scala a scopo curativo. Infatti l'efficienza del processo di clonaggio è ancora molto bassa e la maggior parte degli embrioni prodotti non sopravvive, inoltre, i processi necessari al trasferimento nucleare (come ad esempio l'enucleazione dell'oocita, il trasferimento al suo interno del nucleo della cellula somatica di partenza e l'attivazione dei processi che promuovono l'inizio della divisione dell' oocita clonato) risultano essere molto complessi e non del tutto standardizzati. In aggiunta, risulta complicato sincronizzare il ciclo cellulare dell' oocita a quello della cellula donatrice<sup>55, 56</sup>.

### ***Riprogrammazione e cellule staminali pluripotente indotte (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSC)***

La riprogrammazione cellulare è una tecnica che implica la de-differenziazione delle cellule somatiche adulte (ad esempio fibroblasti) in cellule staminali pluripotenti bypassando i problemi etici che concernono l'uso di cellule embrionali. Il Professor Shinya Yamanaka, dell'Università di Kyoto, è stato il primo a scoprire che i fibroblasti murini sia embrionali che adulti potevano essere riprogrammati in uno "stato pluripotente indotto"<sup>57</sup>. Queste cellule "riprogrammate" mostravano le caratteristiche specifiche delle ESCs quali autorinnovamento, espressione genica di marker specifici, formazione di corpi embrionici *in vitro* e teratomi *in vivo* ma, pur essendo pluripotenti, non erano in

grado di formare chimere funzionali ed il loro stato epigenetico si trovava a metà fra quello delle cellule somatiche e quello delle staminali suggerendo una non completa riprogrammazione.

Sebbene la tecnica sia stata affinata e migliorata nel tempo, con buoni risultati riscontrati anche su cellule umane<sup>58-61</sup>, i meccanismi molecolari che intervengono in questo processo non sono ancora del tutto chiari e questo ne limita le applicazioni cliniche.

### ***Cellule staminali adulte e cellule staminali mesenchimali***

Le cellule staminali adulte (Adult stem cells, ASCs) furono descritte per la prima volta da Till e McCulloch studiando i meccanismi con i quali il midollo osseo poteva rigenerarsi dopo esposizioni radioattive<sup>62</sup>. Le ASCs sono cellule indifferenziate che si trovano all'interno dei tessuti dell'organismo ed hanno la capacità di autorinnovarsi e differenziare in cellule specializzate sia del tessuto in cui risiedono sia degli altri distretti circostanti. Il loro ruolo primario è quello di mantenere l'omeostasi tissutale in risposta ad un evento traumatico nonché quello di garantire il regolare turnover cellulare<sup>30</sup>.

La ricerca sulle ASCs ha subito un notevole incremento negli ultimi 20 anni e questo ha portato alla caratterizzazione di diverse popolazioni cellulari a seconda dei tessuti di provenienza fra i quali, oltre al midollo osseo, troviamo l'epidermide ed il tessuto nervoso, solo per citarne alcuni<sup>63-65</sup>. Con il tempo si è scoperto che la loro presenza è pressoché ubiquitaria e questo ha indotto i ricercatori a considerarne il possibile utilizzo terapeutico per la cura di malattie degenerative.

In questo contesto, le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono quelle che hanno riscontrato maggior interesse. Le MSC sono cellule multipotenti e sono

presenti in vari tessuti, sia adulti che fetali, come midollo osseo, sangue di cordone ombelicale, polpa dentaria, placenta, muscolo e tessuto adiposo <sup>66</sup>. La loro derivazione è mesodermica, cioè provengono dal foglietto embrionale intermedio (chiamato appunto mesoderma) dal quale prendono origine i tessuti connettivi dell'organismo. Il mesoderma differisce notevolmente dagli altri foglietti embrionali poiché non è costituito esclusivamente da cellule, ma, anche da un'abbondante matrice extracellulare. Le MSC sono caratterizzate *in vitro* dalla capacità di adesione nelle fiasche di coltura, da una morfologia simil-fibroblastica e da un elevato grado di proliferazione. Inoltre, possono essere mantenute in coltura per diversi passaggi senza riscontrare alterazione del cariotipo <sup>67</sup>. La peculiarità delle MSC sta nella loro capacità di differenziarsi in cellule dell'osso, della cartilagine, muscolari ed in altri tipi cellulari di derivazione mesodermica (figura 1.1) a seconda dell'ambiente extracellulare in cui si trovano. Tuttavia, diversi autori, ne hanno descritto la possibilità di differenziamento in cellule di derivazione ectodermica (neuroni) <sup>69</sup> ed endodermica (epatociti) <sup>70</sup> anche se la formazione di cellule dei tessuti non mesodermici è ancora controversa a causa della mancanza di sufficienti studi *in vivo* <sup>71</sup>. Le MSC hanno anche il vantaggio di poter essere isolate in grande quantità che unito alla loro elevata plasticità ed all'abilità di promuovere la crescita cellulare, la riparazione tissutale, la capacità di modulare o sopprimere la risposta infiammatoria <sup>72 73 74</sup>. ha permesso l'avvio di diversi studi clinici <sup>66</sup>.

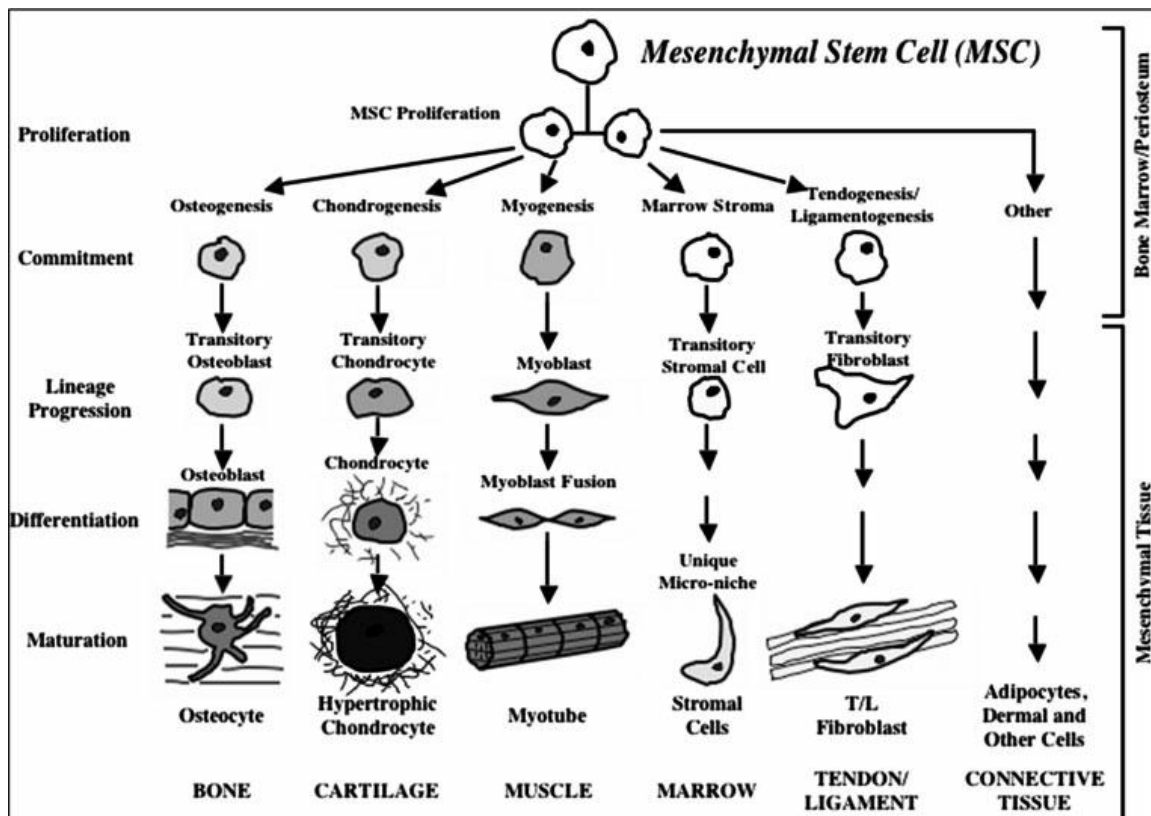


Figura 1.1. Potenziale differenziativo delle MSC <sup>75</sup>

La caratterizzazione delle MSC rimane ancora un campo da approfondire data la non uniformità dei marcatori specifici. Il loro profilo immunofenotipico varia a seconda della specie, della fonte e del numero di passaggi <sup>76</sup>. Convenzionalmente è stato stabilito che tali cellule sono positive ai marker di superficie CD29, CD73, CD90, CD105, CD44 e CD166 mentre sono negative a CD14, CD31, CD34 e CD45; tuttavia alcuni pattern di espressione di marker superficiali sono oggetto di studio come, ad esempio, la presenza di CD34 nelle cellule umane <sup>77 78</sup>, CD44 nelle cellule ovine <sup>79</sup> e CD44 e CD105 nel coniglio <sup>80</sup>. Inoltre, benché multipotenti, esse esprimono anche OCT4, NANOG, e SOX2, analogamente alle ESCs, il cui scopo è quello di regolare la potenzialità, l'autorinnovamento e la proliferazione <sup>77 81 82</sup>. Entrando più nel dettaglio, il fattore OCT4 ha la funzione di regolare la formazione dell'embrione e del mantenimento della massa interna embrionale <sup>83</sup>, SOX2 regola

l'espressione di OCT4 e mantiene lo stato di pluripotenza delle ESC mentre NANOG garantisce l'autorinnovamento<sup>66, 81</sup>.

La fonte elettiva delle MSC rimane ancora il midollo osseo, tuttavia la loro estrazione si avvale di tecniche ancora invasive e dolorose. Per evitare ciò, si è cercato di scovare nuovi distretti dai quali attingere per 'isolarle fra i quali osso trabecolare, periostio, membrana sinoviale, muscolo scheletrico, sangue periferico, legamenti periodontali e cordone ombelicale<sup>84</sup> ma, sfortunatamente, la scarsa quantità di cellule ottenute richiede vari gradi di espansione e manipolazione il che ne limita l'utilizzo sia preclinico che clinico in quanto soddisfare i requisiti di efficacia e sicurezza può risultare complesso<sup>85</sup>.

### ***MSCs da tessuto adiposo (Adipose Derived Stem Cells, ADSCs)***

La ricerca di fonti alternative di MSC per migliorare sia la resa che il grado di sicurezza, ha portato allo sfruttamento del tessuto adiposo. Quest'ultimo è pressoché ubiquitario e può essere estratto in gran quantità tramite tecniche minimamente invasive di lipoaspirazione<sup>30 86 87</sup>. Come il midollo osseo, anche, il tessuto adiposo è di derivazione mesenchimale ed è costituito per il 90% da adipociti mentre la restante parte è definita frazione stromale vascolare (stromal vascular fraction, SVF) in cui sono presenti preadipociti, fibroblasti, cellule muscolari lisce, cellule endoteliali, monociti, macrofagi, linfociti ed, appunto, ADSCs<sup>88</sup>. Rispetto alle cellule isolate da altri distretti dell'organismo, le ADSC sono presenti in numero maggiore in rapporto alla quantità di campione prelevato e questo permette la produzione di colture di massa senza il pericolo di un cambiamento del profilo di staminalità<sup>89</sup>. Come in generale per tutte le MSCs, il pool dei marker di staminalità non è ancora universalmente definito ma è appurata la positività sia per CD29, CD44, e CD90 (in linea con i



profili di espressione delle MSC ottenute da midollo osseo) che per CD13, CD49 e CD105 mentre non presentano la maggior parte degli antigeni emopoietici come CD14, CD31, CD45 e CD144<sup>86, 90</sup>. Inoltre, è stata dimostrata anche una positività al CD34, proteina di solito non espressa nelle staminali mesenchimali, la cui presenza, però, non sembra comprometterne la multipotenzialità<sup>86</sup>. Riguardo quest'ultimo punto, nel 2002 Zuk ed il suo gruppo di ricerca hanno eseguito un'analisi molecolare per valutare la capacità differenziativa delle ADSCs in senso osteogenico, condrogenico ed adipogenico<sup>90</sup>. I dati ottenuti sono stati confermati da una serie di lavori successivi i quali hanno descritto l'utilizzo di diversi fattori induttivi come agenti promotori del differenziamento, come desametasone, fattori di crescita, ormoni, condizioni di ipossia, stress meccanico e diversi biomateriali<sup>91-98</sup>. Ad esempio, il differenziamento osteogenico può essere ottenuto tramite colture tridimensionali utilizzando come supporto collagene, PLGA, fosfato tricalcico, nanotubi di carbonio, seta, vetro bioattivo e policaprolattone<sup>99-107</sup>. Il differenziamento condrogenico è stato ottenuto combinando fattori di crescita della famiglia dei TGF- $\beta$ s con colture in mono strato ad alta densità o pellet cellulari<sup>108-111</sup> ma, come per l'osteogenesi, anche tramite coltivazione in matrici 3D a base di agarosio, alginato, gelatina, scaffold di acido ialuronico ed elastina i quali hanno mostrato una capacità nell'indurre un aumento delle espressioni di collagene di tipo II, aggregano e proteoglicani solforati, marker specifici della cartilagine<sup>112-114</sup>. Lo stesso risultato è stato ottenuto con materiali funzionalizzati in grado di rilasciare TGF- $\beta$ s ed insulina<sup>115,116</sup>.

La potenzialità delle ADSCs è stata descritta anche per cellule caratteristiche di tutta la linea mesodermica. Vari autori ne hanno dimostrato il potenziale miogenico descrivendo la formazione di cellule multinucleate che esprimevano

marker come miogenina, MyoD1 e miosina del muscolo scheletrico<sup>117-119</sup> ed è ragionevole pensare che la capacità di produrre cellule muscolari possa avere un grande impatto nelle terapie di patologie altamente invalidanti come la distrofia muscolare, anche se ancora non è stata riscontrata nessuna evidenza sulla capacità contrattile delle cellule differenziate. Analogamente è stata dimostrata anche la formazione di cellule muscolari lisce utili, ad esempio, nella ricostruzione di organi interni, la rigenerazione dei muscoli peristaltici o la riparazione dei vasi sanguigni. In questo caso è stato dimostrato che le ADSCs seminate su uno scaffold composto da nanofibre elastiche, e soggetto a sollecitazioni meccaniche, mostravano un aumento dell'espressione di calponina, caldesmone e miosina del muscolo liscio<sup>120, 121</sup>. Altri studi hanno descritto come tali marker sono espressi quando le ADSCs sono seminate su matrici vascolari decellularizzate suggerendone un potenziale ruolo nel TE vascolare<sup>122</sup>. Uno degli aspetti più affascinanti riguarda la possibilità di differenziamento in cardiomiociti dotati di proprietà contrattili ritmiche autonome. Nel 2003 Rangappa ed i suoi collaboratori hanno identificato l'espressione di marker cardiaci in ADSCs di coniglio trattate con 5-azacitidina<sup>123</sup>. La cardiomiogenesi è stata ottenuta *in vitro* anche rivestendo delle piastre di coltura con lamina, tramite deprivazione del siero ed aggiunta di esteri del forbolo<sup>124-126</sup>. Infine, se opportunamente stimulate, le ADSCs, vanno incontro a differenziamenti in cellule di derivazione ectodermica ed endodermica come neuroni, cellule gliali, cellule epidermiche, cellule epatiche e pancreatiche<sup>127</sup>.

## 2. Scaffold e Biomateriali

L'utilizzo di materiali sintetici e naturali per la riparazione o sostituzione di parti del corpo è stato sempre oggetto di interesse sin dall'antichità. Ad esempio, è ben noto che le civiltà egizie costruivano alluci fatti di legno e cuoio da utilizzare come protesi artificiali. Durante il ventesimo secolo, la scoperta e lo sviluppo di materiali come il teflon e i siliconi ha avviato un nuovo filone di ricerca che ha portato alla realizzazione di una vasta gamma di dispositivi medici applicabili sull'uomo. Sebbene tali dispositivi garantissero un supporto strutturale, essi non riuscivano a ripristinare la funzionalità del tessuto originale. Nel tempo, le ricerche in biologia cellulare e molecolare hanno portato ad una maggiore comprensione del ruolo della matrice extracellulare (ECM) e dell'azione dei fattori di crescita. L'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sullo sviluppo di biomateriali con lo scopo di ricreare le funzioni fisiologiche di un tessuto. Da qui nasce il concetto di scaffold, ovvero una matrice tridimensionale che ha lo scopo di garantire l'adesione e la crescita cellulare in modo da promuovere la formazione di nuovo tessuto biologico. Uno scaffold, inoltre, deve poter garantire anche la veicolazione ed il rilascio di fattori bioattivi (ad esempio fattori di crescita e di adesione) nel sito desiderato dell'organismo

10 128

Le caratteristiche principali che contraddistinguono una matrice tridimensionale sono:

- (i) **Biocompatibilità.** Le cellule devono aderire, migrare sulla superficie o all'interno del materiale ed essere funzionali per poter iniziare a deporre matrice di nuova sintesi. Inoltre, una volta impiantata nell'organismo non deve portare all'insorgenza di reazioni immunitarie o risposte infiammatorie le quali

diminuirebbero le possibilità di guarigione o, peggio ancora, potrebbero portare ad un rigetto da parte dell'ospite.

(ii) Biodegradabilità. Le cellule dell'organismo devono essere in grado di rimpiazzare lo scaffold con tessuto di nuova formazione, quindi, questo non va inteso come un impianto permanente ma come un supporto temporaneo. Inoltre i suoi prodotti di degradazione devono essere atossici e facilmente eliminabili<sup>129</sup>.

(iii) Proprietà meccaniche adeguate. Idealmente uno scaffold deve avere le stesse proprietà meccaniche del distretto nel quale va impiantato e, contemporaneamente, deve essere abbastanza resistente per essere manipolato durante l'impianto. Sebbene questo concetto sia importante per tutti i tessuti, è fondamentale nelle applicazioni ortopediche dove l'integrità meccanica deve essere mantenuta per tutto il completamento del ciclo di guarigione<sup>130</sup>. Inoltre, nell'ambito della rigenerazione ossea, le difficoltà aumentano a causa del fatto che la velocità di guarigione varia con l'età<sup>1</sup>.

(iv) Architettura adatta. La porosità ed il grado di interconnessione fra i pori sono parametri fondamentali di cui tener conto durante la progettazione di uno scaffold. L'architettura del supporto deve assicurare la colonizzazione da parte delle cellule nonché la diffusione di nutrienti e la fuoriuscita dei materiali di scarto, soprattutto nelle porzioni più interne le quali non sono in grado di sfruttare la vascolarizzazione del tessuto di alloggio. Oltre al numero, è molto importante anche la grandezza dei pori. Infatti, le cellule per poter aderire al materiale hanno bisogno di strutture molecolari superficiali chiamate ligandi (ad esempio il tripeptide Arg-Gly-Asp, RGD) presenti in molti biomateriali di origine naturale<sup>131</sup>; la probabilità che le cellule hanno di interagire con tali strutture è direttamente proporzionale alla superficie dello scaffold al quale, a sua volta,

dipende dal diametro dei pori che lo compongono. Inoltre, i pori devono essere sufficientemente grandi da permettere alle cellule di migrare al loro interno ma, al tempo stesso, abbastanza piccoli da assicurare un rapporto superficie/volume favorevole per far aderire un numero di cellule adeguato <sup>132</sup>. Il valore ideale del diametro varia a seconda del tipo cellulare utilizzato, tale fattore va preso in considerazione durante la progettazione di uno scaffold <sup>133</sup>.

(v) Facilità di produzione. Uno scaffold per essere commercializzato ed impiegato nella pratica clinica dovrebbe essere ottenuto con materiali poco costosi e tecniche semplici in modo da permetterne la produzione su larga scala. È, inoltre, necessario tenere conto degli standard GMP (good manufacturing practice), in quanto rappresentano un fattore fondamentale per trasporre un concetto di laboratorio nella terapia clinica <sup>134</sup>.

Le caratteristiche appena descritte sono in funzione sia delle tecniche di produzione e, soprattutto, dipendono dal materiale di cui uno scaffold è costituito. Un biomateriale è definito come “una sostanza (diversa da un farmaco), o una combinazione di sostanze, che può essere impiegata sia come tale che come parte di un sistema, al fine di trattare, potenziare, sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo” <sup>1</sup>. Generalmente i biomateriali sono suddivisi in tre classi a seconda della loro origine: naturali (es. collagene, alginato e gelatina), sintetici (es. PLA, PLGA) e ceramici (es. idrossiapatite) <sup>1</sup>. Mentre i materiali naturali hanno il potenziale vantaggio della ricognizione biologica, i polimeri sintetici possono essere ottenuti in maniera riproducibile e su vasta scala con la possibilità di controllarne le proprietà chimico-fisiche, la cinetica di degradazione e la microstruttura<sup>10</sup>.

## 2.1 Materiali naturali

I materiali naturali usati per la produzione di scaffold possono derivare dalle componenti della membrana extracellulare (ad esempio collagene, fibrinogeno, acido ialuronico e glicosaminoglicani) e, generalmente, hanno il vantaggio di essere bioattivi, biocompatibili e di avere proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto di appartenenza<sup>135,136,137,138</sup>. Altre fonti naturali includono i composti derivati dalle piante ed insetti fra i quali chitosano, alginato e seta<sup>139,140,141</sup>. Come già detto, nonostante predirne il comportamento possa risultare complesso, il loro utilizzo è in costante crescita sia nella ricerca di base che nella pratica clinica.

Ad esempio, il Matrigel è assortimento proteico estratto da tumori murini costituito principalmente da laminina, collagene di tipo IV ed eparina<sup>142</sup> ed è una sostanza ampiamente utilizzata per studi *in vitro* ed *in vivo*. È un valido sostituto della ECM nello studio di tumori ed ha la capacità di mantenere le cellule staminali in uno stato proliferativo ed indifferenziato. *In vivo* trova applicazione come strumento per la valutazione dell'angiogenesi in patologie tumorali ma si è visto che se utilizzato come veicolo di cellule staminali terapeutiche, ha la capacità di inibire la crescita di cellule tumorali pancreatiche<sup>144, 145</sup>. Inoltre è stato dimostrato in modelli murini che le ADSCs disperse in matrigel promuovono la neovascolarizzazione di aree ischemiche<sup>146</sup>.

L'acido ialuronico è fra i biomateriali che suscita più interesse nell'ambito del TE in quanto nel suo ambiente naturale ha la caratteristica di facilitare la crescita ed il movimento delle cellule regolando l'idratazione e l'osmolarità dei tessuti<sup>147</sup>. Nell'organismo è presente in forma gelatinosa ma, opportunamente modificato, può essere trasformato in fibre, membrane o microparticelle<sup>140</sup>. Fra i materiali a base di acido ialuronico abbiamo lo HYAFF<sup>148,149</sup>, un prodotto

commerciale altamente biodegradabile che spesso è usato come supporto cellulare nello studio e nella riparazione di tessuti dell'apparato locomotore. Utilizzando questo prodotto, Cristino ed i suoi collaboratori hanno riprodotto un modello di tendine utilizzando MSCs dimostrando un aumento dell'espressione cellulare di proteine del legamento seguita da una diminuzione dei marker osteogenici e condrogenici <sup>150</sup>. Altri autori, invece, hanno dimostrato come un particolare tipo di HYAFF, lo HYAFF-11, sia promotore di un differenziamento condrogenico <sup>151, 152</sup>. Gli esteri dell'acido ialuronico sono stati, inoltre, utilizzati per il trattamento di ferite ulcerose ed è stata anche dimostrata la loro capacità nel promuovere il ripristino del tessuto cardiaco dopo infarto del miocardio <sup>153</sup>.

La seta è un polimero utilizzato in chirurgia come materiale di sutura e la sua versatilità lo rende un candidato interessante nell'ambito del TE. Diversi studi hanno dimostrato il suo supporto nella rigenerazione neuronale, nella guarigione da traumi da bruciatura, nella rigenerazione vascolare e in vari campi della ricerca ortopedica <sup>154-158</sup>.

Il chitosano, sostanza isolata dal carapace dei crostacei che ha le caratteristiche di essere idrofilico, biodegradabile e biocompatibile e che presenta proprietà simili ai quelle dei glicosaminoglicani <sup>140</sup>. È stato uno dei primi biomateriali utilizzati per la cura di traumi cutanei in quanto ha la capacità di accelerare la guarigione delle ferite superficiali reclutando globuli bianchi e fibroblasti <sup>159</sup>. Il suo potenziale nel TE è stato dimostrato da diversi studi nei quali è descritto il suo utilizzo nella produzione di analoghi tissutali di pelle, cartilagine, osso, fegato e tessuto nervoso <sup>160</sup>.

Il collagene è la proteina più abbondante che si trova nel nostro organismo e viene ottenuto da tessuti animali tramite trattamenti enzimatici ed estrazione acida o basica <sup>161</sup>. La sua applicazione nell'uomo è stata approvata per la cura

di ferite cutanee e come matrice sostitutiva della pelle <sup>162</sup>. La frazione più abbondante di collagene è quella di tipo I ed è anche la porzione più utilizzata nell'ambito dell' ingegneria tissutale, sotto forma di scaffold poroso, fibrille o idrogel, soprattutto per la rigenerazione di tessuti muscoloscheletrici <sup>163</sup>. Pellet MSCs umane sono stati seminati in una matrice di collagene II, componente fondamentale della cartilagine ialina, isolato da cartilagine bovina ed è stato dimostrato che, in queste condizioni, le cellule mostravano un elevato grado di organizzazione strutturale contemporaneo ad un aumento della produzione di ECM cartilaginea sia *in vitro* che *in vivo* <sup>164</sup>.

Infine, gelatina ed alginato sono due tra i biomateriali naturali più usati nello studio della rigenerazione tissutale ed il loro ruolo verrà approfondito in seguito.

## **2.2. Materiali sintetici**

I polimeri sintetici hanno avuto un grande impatto nella rigenerazione tissutale poiché le loro caratteristiche chimico-fisiche e la loro struttura possono essere finemente controllate in sede di sintesi offrendo la possibilità di produrre scaffold su misura e per applicazioni specifiche sia *in vitro* che *in vivo*. I materiali di sintesi sono spesso più economici e duraturi dei composti biologici ed, inoltre, possono essere prodotti facilmente in larga scala <sup>165</sup>. Fra questi, quelli che hanno riscosso un maggior successo sono i poliesteri degli  $\alpha$ -idrossi acidi PLA (acido polilattico), PGA (acido poliglicolico) e PLGA (acido polilattico-co-glicolico) già usati da tempo per applicazioni chirurgiche<sup>9, 166</sup>. I legami esteri contenuti nelle sostanze appena citate non richiedono un'azione enzimatica per essere scissi in quanto sono idroliticamente labili ed i loro prodotti di degradazione, sono due metaboliti naturali non tossici e facilmente eliminabili



<sup>167</sup>. Spesso sono usati come veicolanti nel *drug delivery* ma trovano impiego anche nell'ambito della medicina rigenerativa, perlopiù in quella del tessuto osseo, spesso in associazione con materiali ceramici <sup>167, 168</sup>, epatica e vascolare<sup>169, 170</sup>. In aggiunta è stato dimostrato come PLA, PGA e PLGA possano supportare la crescita e l'organizzazione spaziale delle ESC e ADSCs <sup>171</sup>.

Un altro materiale molto utilizzato è rappresentato dal poli(ε-caprolattone, PLC). Tale polimero è facilmente lavorabile in quanto presenta un basso punto di fusione (circa 60°C) e le sue proprietà meccaniche possono essere regolate intervenendo sulla cristallinità<sup>139</sup>. È utilizzato come materiale di sutura e nella riparazione di difetti ossei e cartilaginei <sup>172-174</sup> così come in studi di differenziamento di cellule staminali <sup>140, 175</sup>.

Altri biomateriali sintetici utilizzati sono le polianidriti (PA), il polietilen-tereftalato (PET) il polietilen-glicole (PEG) ed la poliacrilamide (PAA) <sup>139</sup>.

### **2.3. Materiali ceramici**

Le ceramiche bioattive come l'idrossiapatite (HAP), il fosfato tricalcico (TCP) ed alcune miscele di fosfati e silicati (*bioactive glasses*) hanno la capacità di reagire con i fluidi dell'organismo ed interagire con le cellule legandosi sia nei tessuti duri sia, ma in maniera minore, nei tessuti molli <sup>176</sup>. Questi composti sono conosciuti per la loro biocompatibilità e l'alta resistenza a compressione ed erosione ma, allo stesso tempo, sono molto fragili, hanno una bassa affidabilità meccanica e mancano di elasticità. Nonostante questo, se usati in associazione con materiali polimerici, ne migliorano la biocompatibilità e le proprietà generali regolandone anche il grado di degradazione <sup>177</sup>. Alcune ceramiche bioattive come il bioglass, l'idrossiapatite sinterizzata e la vetro-ceramica, sono già utilizzate in clinica come sostituti di tessuti duri <sup>178, 179</sup>.

### 3. Stimoli chimici e fisici

Le cellule dell'organismo richiedono continuamente sia input chimici che meccanici per svolgere le loro funzioni e mantenere l'omeostasi di un tessuto. Nel corso degli anni si è cercato di riproporre il microambiente extracellulare su scala di laboratorio cercando di capire in che modo si potesse agire sulle cellule per indirizzarne il comportamento. Ad esempio, è ampiamente documentato che la presenza di molecole come ormoni (desametasone, idrocortisone), indometacina, acido ascorbico e  $\beta$ -glicerofosfato promuovono il differenziamento delle MSCs in cellule del apparato muscoloscheletrico e del tessuto adiposo<sup>180</sup>.

Lo stimolo chimico maggiore è rappresentato dai fattori di crescita (GF), sostanze che giocano un ruolo fondamentale regolando la proliferazione, il differenziamento e la senescenza cellulare. A differenza degli ormoni che agiscono in maniera endocrina, i GF hanno una bassa emivita, una scarsa capacità di diffusione e svolgono la loro funzione localmente, diffondendo attraverso la matrice extracellulare. La loro azione dipende dalla cellula bersaglio in cui essi agiscono e dal tipo di recettore a cui si vanno a legare<sup>181</sup>. In tabella 3.1. sono riportati alcuni esempi. Riguardo all'azione fisiologica ed il tessuto bersaglio.

L'utilizzo di alcuni GF è già stato approvato nella pratica clinica; ad esempio il platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB; Regranex) è prescritto per il trattamento delle ulcere diabetiche neuropatiche mentre le bone morphogenetic factor-2 (BMP-2) e BMP-7 (InFUSE™ Bone Graft/LT-Cage™ e OP-1 Putty) vengono usati, rispettivamente, per il trattamento di fratture spinali e tibiali<sup>182</sup>. L'ingegneria tissutale è fortemente dipendente dall'utilizzo dei GF in quanto hanno la capacità di promuovere il differenziamento di cellule staminali sia in

presenza sia in assenza di matrici tridimensionali. Ad esempio MSCs coltivate in presenza di TGF- $\beta$ 1, BMP-2 e BMP-7 differenziano in senso osteogenico (anche se è stato riscontrato che variando la concentrazione di tali fattori può variare anche il tipo di differenziamento<sup>181, 183</sup>); l'utilizzo del platet derived growth factor (PDGF) e basic fibroblast growth factor (bFGF) insieme alla 5-azacitidina promuove il differenziamento in cellule muscolari<sup>180, 184</sup> mentre la famiglia dei growth differentiation factors (GDF) ed il TGF- $\beta$ 3 hanno trovato applicazione nel differenziamento in cellule della cartilagine e del tendine<sup>185</sup>.

Oltre a segnali chimici, anche le risposte delle cellule alle sollecitazioni fisiche e meccaniche sono dei parametri di cui tener conto quando si parla di rigenerazione tissutale. Il termine “trasduzione meccanica” si riferisce a tutti quei processi nei quali le cellule traducono gli stress meccanici in segnali biochimici per regolare le loro funzioni. Lo sforzo di taglio, il flusso dei liquidi, la compressione e la tensione non solo alterano l'organizzazione e la distribuzione degli elementi strutturali ma sono anche trasdotti in input molecolari che modulano il network di signaling all'interno e tra le cellule<sup>186</sup>. Esistono delle evidenze marcate che descrivono come questi stimoli agiscono sull'espressione genica promuovendo significativamente l'attività biosintetica in differenti tipi cellulari<sup>187</sup>. Inizialmente l'effetto è stato studiato sulle cellule ossee<sup>188, 189</sup>, ma più recentemente è stato dimostrato che anche cellule non appartenenti al tessuto scheletrico possono rispondere in maniera specifica se opportunamente stimulate (ad esempio le cellule della pelle). Altri studi sugli effetti degli stress meccanici sul metabolismo cellulare hanno dimostrato che un tessuto può rispondere ad una stimolazione meccanica data dal flusso dei fluidi interstiziali indotto da un carico esterno<sup>188</sup>.

Tabella 3.1. Elenco e funzione di alcuni fattori di crescita e differenziativi<sup>181</sup>

Fattore	Tessuti bersaglio	Funzione
Ang-1	Vasi sanguigni, cuore, muscoli	Maturazione e stabilità dei Vasi sanguigni
Ang-2	Vasi sanguigni	Destabilizza, e dissocia le cellule endoteliali nei tessuti circostanti
FGF-2	Vasi sanguigni, osso, pelle, nervi	Migrazione, proliferazione e sopravvivenza delle cellule endoteliali; inibizione del differenziamento delle ESC
BMP-2	Osso, cartilagine	Differenziamento e migrazione degli osteoblasti
BMP-7	Osso, cartilagine, rene	Differenziamento e migrazione degli osteoblasti; sviluppo renale
EGF	Pelle, nervi	Regolazione della crescita e differenziamento delle cellule epiteliali
EPO	Nervi, sangue	Sopravvivenza dei globuli rossi e loro maturazione
HGF	Osso, fegato, muscolo	Proliferazione, migrazione e differenziamento delle MSC
IGF-1	Muscolo, osso cartilagine, fegato, polmone, rene, nervi	Proliferazione cellulare ed inibizione dell'apoptosi
NGF	Nervi	Sopravvivenza e proliferazione di cellule neuronali
PDGF	Vasi sanguigni, muscolo, osso, cartilagine, pelle	Sviluppo embrionale, proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali
TGF- $\alpha$	Nervi, pelle	Proliferazione di cellule basali e neuronali
TGF- $\beta$	Osso, cartilagine	Proliferazione e regolazione dello sviluppo dell'osso e la cartilagine
VEGF	Vasi sanguigni	Sopravvivenza e proliferazione di cellule endoteliali

Abbreviazioni. Ang, angiopoietin; bFGF, basic fibroblast growth factor; BMP, bone morphogenetic protein; EGF, epidermal growth factor; FGF, fibroblast growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; IGF, insulin-like growth factor; NGF, nerve growth factor, PDGF, platelet-derived growth factor; TGF, transforming growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Altre ricerche hanno confermato che le integrine hanno il compito di mediare il trasferimento dei segnali meccanici all'interno della cellula e che la trasduzione del segnale si verifica per mezzo di particolari complessi citoscheletrici la cui attivazione influenza la proliferazione ed il differenziamento cellulare nonché la motilità ed i segnali di apoptosi<sup>190, 191</sup>. Alcuni esempi sono dati dalla dimostrazione di come fibroblasti della pelle possono differenziare in mioblasti se sottoposti a stress meccanico<sup>192</sup> ed è ben noto che gli sforzi di taglio hanno un effetto sulla morfologia, orientamento e proliferazione delle cellule vascolari. L'esposizione ad un flusso di liquidi di una coltura in monolayer di condrociti primari ha mostrato come possa attivare il *pathway* della via di *signaling* MEK1/ERK con conseguente down-regolazione dell'espressione genica di aggregano<sup>193</sup> mentre l'esposizione di un costrutto cartilagineo ad una compressione dinamica continua a frequenza fisiologica ha portato ad un aumento della sintesi di ECM<sup>194</sup>.

La sinergia fra segnali chimici e fisici è stata resa possibile tramite l'uso di bioreattori, strumenti che permettono di automatizzare e standardizzare le tecniche di TE, provvedere al mantenimento dell'apporto di nutrienti e mantenere un'omogenea distribuzione cellulare oltre a ricreare le condizioni meccaniche e biochimiche che intervengono su un determinato tessuto nell'organismo<sup>14</sup>.

## **4. Cartilagine Articolare**

### **4.1. Struttura e patologie della cartilagine articolare**

La cartilagine articolare è un tessuto avascolare ed aneurale che ricopre la superficie delle diartrosi con la funzione di dissipare le forze di carico e di diminuire la frizione a livello delle articolazioni. È costituita da acqua (60-85%),

da un abbondante ECM e da cellule specializzate, i condrociti<sup>174</sup>. Questi ultimi sono l'unico tipo di cellule che compongono la cartilagine ialina; sono organizzati in cluster (gruppi esogeni), e sono caratterizzati da basofilia citoplasmatica e da un'intensa attività proteica che si traduce in un'elevata produzione di matrice extracellulare<sup>195,196</sup>. La ECM è costituita prevalentemente da collagene tipo II e proteoglicani fra cui acido ialuronico, condroitina solfato e cheratina solfato ed è questo particolare quadro istologico che le dà delle proprietà meccaniche adatte a sopportare i carichi che continuamente gravano sull'apparato scheletrico<sup>197, 198</sup>. Durante il corso della vita, il tessuto cartilagineo va incontro ad un continuo rimodellamento da parte dei condrociti in quanto questi continuano a produrre matrice extracellulare in risposta sia alla degradazione proteica sia agli stimoli esterni<sup>196, 199</sup>. In condizioni fisiologiche, l'omeostasi è mantenuta da questa fine regolazione, se questo bilanciamento è sfasato, si ha una progressiva perdita dei componenti macromolecolari della ECM seguita dalla degradazione del tessuto e conseguente comparsa di patologie osteocondrali che, nella maggioranza dei casi, progrediscono inesorabilmente in conseguenza della avascolarità della cartilagine ed della sua bassa capacità di auto-riparazione<sup>198</sup>. L'insorgere di queste patologie dipende da vari fattori come età, eccessivo carico a livello delle articolazioni, traumi, cambiamenti biomolecolari dell'organismo e predisposizione genetica.

#### **4.2. TE per il trattamento di danni alla cartilagine articolare**

La cura delle patologie degenerative della cartilagine è una delle maggiori sfide del 21°. Il trattamento clinico si basa convenzionalmente sulla fisioterapia spesso accompagnata dall'uso di farmaci analgesici, antinfiammatori non

steroidi e/o agenti protettori (condroitina solfato, glucosamina solfato, acido ialuronico). Altre terapie coinvolgono l'uso di corticosteroidi, PRP (Platelet-Rich Plasma), *microfracturing*, ablazione con radiofrequenza (RFA) e trapianto osteocondrale<sup>199, 201, 202</sup>. In molti casi, queste opzioni sono palliative, migliorando solo parzialmente la sintomatologia ed, in più, l'eventuale formazione di tessuto è associata alla sostituzione di cartilagine ialina con cartilagine fibrosa la quale non presenta le stesse caratteristiche di resistenza e deformabilità al carico<sup>203</sup>. Comunque, una migliore comprensione molecolare, biologica e strutturale delle componenti della struttura cartilaginea ha permesso lo sviluppo di nuove tecniche per la progettazione di terapie biologiche con lo scopo di riparare e/o rigenerare la cartilagine danneggiata.

### ***Terapia cellulare***

La maggior parte di queste procedure è stata pensata per generare neo-cartilagine con lo scopo di offrire ai pazienti con patologie osteocondrali una migliore qualità della vita ed una cura definitiva. L'impianto di condrociti autologhi (metodo ACI) è stato il primo approccio riguardante il TE e fu descritto per la prima volta da Brittberg ed i suoi collaboratori<sup>204</sup>. Questa tecnica si basa sull'ottenimento di una biopsia in artroscopia di cartilagine sana in un punto di non carico, la porzione di tessuto viene trattata enzimaticamente in modo da ottenere una popolazione di condrociti sani isolati i quali, a loro volta, sono espansi *ex vivo*. Una volta raggiunto un numero adeguato di cellule, queste vengono iniettate sotto un lembo di periostio a livello della lesione aspettando che crescano e maturino nel tempo<sup>203</sup>. Tale trattamento, però, richiede un doppio intervento chirurgico ad una distanza di 8 settimane<sup>205</sup> e trial clinici randomizzati non hanno evidenziato un reale miglioramento del

quadro clinico dopo 5 anni rispetto alle tecniche convenzionali<sup>206</sup>, inoltre, non è esente da potenziali rischi come l'ipertrofia periostale o artrofibrosi<sup>207 208</sup>. Inoltre, il suo utilizzo è ostacolato anche dalla difficoltà di mantenere i condrociti in coltura senza che essi perdano la capacità di produrre cartilagine ialina in quanto, dopo pochi passaggi, tendono a de-differenziare<sup>209 210</sup>. Una variante del trattamento ACI è rappresentato dall'utilizzo di cartilagine articolare particellare; sia studi preclinici che clinici hanno dimostrato come la cartilagine tritata possa provvedere ad una fonte cellulare senza che vi sia la necessità di espandere le cellule in coltura<sup>211</sup>.

L'utilizzo delle MSCs è stato più volte considerata come alternativa all'uso di condrociti autologhi per via della loro inclinazione al differenziamento in cellule della cartilagine. I risultati di diversi studi clinici hanno evidenziato come iniezioni intrarticolari di MSCs abbiano portato ad un effettivo miglioramento sulla riduzione del dolore e sia sulla capacità effettiva di rigenerare cartilagine ialina<sup>212 213</sup>.

### ***Scaffold e biomateriali***

Gli scaffold utilizzati per il trattamento di lesioni cartilaginee si dividono in condrocoinduttivi, che supportano la crescita dei condrociti, e condroindusivi, che inducono il differenziamento ed il mantenimento del fenotipo condrogenico<sup>205</sup>. Il collagene è uno dei materiali che trova maggior impiego in questo campo, ad esempio viene utilizzato per migliorare la stimolazione midollare tramite inserzione in microfratture indotte (tecnica AMIC, *Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis*) con risultati rispetto al classico *microfracturing* migliori dopo due anni dall'intervento<sup>214</sup>. Degli scaffold a base di collagene sono stati



utilizzati anche al posto delle patches di periostio nelle procedure ACI ma in questo caso non si hanno ancora dati a lungo termine<sup>215 216</sup>.

Dei materiali a base di acido ialuronico (HYAFF) si è già parlato in precedenza. Questo polimero ha il vantaggio di essere degradato in circa tre mesi durante i quali rilascia acido ialuronico incoraggiando il differenziamento condrogenico. È stato dimostrato, in un modello murino, come lo HYAFF promuova la sintesi di collagene di tipo II ed aggregano ed inibisca la produzione di collagene di tipo I,<sup>205</sup> inoltre in dei trial clinici è descritta la presenza di cartilagine ialina dopo 18 mesi dall'impianto<sup>214</sup>.

Gli idrogel sono materiali polimerici che, in condizioni opportune, possono formare una matrice strutturata in solventi acquosi<sup>217</sup>. Il loro utilizzo nella bioingegneria della cartilagine rappresenta una valida alternativa alle terapie convenzionali in quanto la loro natura permette lo scambio continuo fra l'ambiente esterno ed interno di materiale, il loro elevato contenuto acquoso ricalca l'ambiente cartilagineo e possono essere facilmente iniettati in artroscopia. Fra questi abbiamo il Gelrin, attualmente in sperimentazioni clinica, il cui potenziale condrogenico è stato dimostrato nella sintesi di collagene di tipo II e proteoglicani in un modello ovino<sup>218</sup>.

### ***Fattori di crescita***

Come spiegato in precedenza, anche la crescita e la stimolazione dei condrociti sono regolate da una combinazione di fattori meccanici e chimici; a tale proposito, l'utilizzo di fattori di crescita rappresenta un vantaggio se si parla di cartilagine ingegnerizzata. I fattori considerati condroinduttivi si dividono in 4 famiglie: i *Transforming Growth Factors- $\beta$*  (TGF- $\beta$ s), le *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs, che fanno parte sempr della superfamiglia dei TGF- $\beta$ s) *gli*

*Insulin-like Growth Factors* (IGFs) e i *Fibroblast Growth Factors* (FGFs)<sup>219</sup>. La loro azione è schematizzata in tabella 4.1. In linea generale, tali fattori si pensa siano implicati nel mantenimento del fenotipo cartilagineo delle cellule in coltura, coadiuvano il differenziamento condrogenico di cellule staminali e promuovono la sintesi di collagene di tipo II<sup>220</sup>.

Tabella 4.1. Fattori di crescita che intervengono nella condrogenesi<sup>205</sup>

Fattore di crescita	Azione
Transforming Growth Factors B (TGF- $\beta$ s)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Effetto anabolico sui condrociti;</li> <li>- Mantenimento del fenotipo condrocitario;</li> <li>- TGF-<math>\beta</math>1 promuove la proliferazione cellulare ed inibisce le metalloproteasi;</li> <li>- GDF-5 aumenta la produzione di GAG e collagene di tipo II di condrociti derivati da MSC umane</li> </ul>
<i>Bone Morphogenic Proteins</i> (BMPs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- promuovono il differenziamento condrogenico delle MSC;</li> <li>- BMP-2 migliora il ridefferenziamento dei condrociti dedifferenziati;</li> <li>- BMP-4 e BMP-6 aumentano la sintesi di collagene di tipo II e proteoglicani diminuendo quella del collagene di tipo I;</li> <li>- BMP-2, BMP-12 e BMP-13 aumentano la sintesi di collagene di tipo II e proteoglicani e promuovono la crescita di condrociti in coltura.</li> </ul>
Insulin-like growth factors (IGFs)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IGF-1 promuove la proliferazione dei condrociti</li> <li>- IGF-1 si lega ai proteoglicani impedendo il catabolismo della cartilagine;</li> <li>- L'insulina promuove la condrogenesi</li> </ul>
<i>Fibroblast Growth Factors</i> (FGF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Promuove l'espansione dei condrociti in coltura;</li> <li>- Inibisce la formazione di cartilagine ipertrofica</li> </ul>

### ***Cartilagine ingegnerizzata***

Oltre all'utilizzo di cellule staminali e materiali direttamente impiantati nel sito di lesione, la ricerca per la cura di patologie condrali è incentrata anche sulla produzione di tessuto cartilagineo *in vitro* il quale, una volta prodotto e testato, potrà essere direttamente impiantato a livello delle lesioni soprattutto se circoscritte. È ormai noto che la presenza di un ambiente tridimensionale è imprescindibile per ottenere sia il differenziamento di cellule staminali che il mantenimento di un fenotipo corretto ed, a questo proposito, sono stati testati diversi materiali sia sintetici che naturali quali collagene, seta, pla, plga, alginato, gelatina<sup>221</sup> così come è stato valutato il comportamento di diversi tipi cellulari, partendo dai condrociti nativi, passando le ESCs e iPSCs, fino ad arrivare alle MSCs.

Qualunque sia il materiale ed il tipo cellulare utilizzato, la formazione di un costrutto simile alla cartilagine sembra dipendere da tre parametri: 1) la presenza di fattori di crescita, 2) l'effetto di un carico meccanico, 3) la riproduzione del microambiente cellulare. L'importanza dei fattori di crescita nel terreno di coltura è già stata descritta in precedenza. La stimolazione meccanica da parte della pressione idrostatica, a cui sono sottoposte normalmente le articolazioni, sembra migliorare il differenziamento delle cellule staminali soprattutto in sinergia con i fattori di crescita come dimostrato dall'aumento della sintesi di Sox9 (un fattore di trascrizione chiave per lo sviluppo della cartilagine) contemporanea alla diminuzione dell'espressione di geni associati al differenziamento terminale ipertrofico(collagene tipo X)<sup>222</sup>. Riguardo il microambiente cellulare, la cartilagine, e quindi condrociti, è esposta ad una bassa tensione di ossigeno (2-7%) e questo contribuisce a mantenere un fenotipo stabile. Il mantenimento di MSC in condizioni ipossiche

si traduce nella formazione di condrociti ed alcuni studi suggeriscono che l'ipossia può essere considerata alla stessa stregua dei fattori di crescita <sup>223</sup>.

## Scopo della tesi

Nell'ambito della ricostruzione della cartilagine articolare sono stati fatti notevoli passi in avanti ma la soluzione per il ripristino completo del tessuto sembra ancora essere lontana. Lo studio del tipo di risposta che le cellule hanno in differenti condizioni è alla base di ogni terapia sperimentale che si prepone di curare le patologie osteoarticolari.

Nella prima parte di questo lavoro è stata valutata la capacità di uno scaffold a base di gelatina di indirizzare le ADSCs verso un differenziamento in senso condrogenico. Successivamente, con lo scopo di migliorare il grado di differenziamento e diminuire i costi associati all'utilizzo di fattori differenziativi, l'attenzione è stata posta sullo sviluppo di un biomateriale a base di alginato e ioni cobalto in modo da mimare e sfruttare le caratteristiche fisiche della cartilagine piuttosto che il suo intorno chimico. In ultimo, è stato sviluppato un sistema *low cost* per la produzione di chip microfluidici sfruttabili per la realizzazione di sistemi micrometrici per incapsulazione cellulare.

## **Materiali e metodi**

### **5. Valutazione dell'efficienza di differenziamento in senso condrogenico di ADSC seminate su uno scaffold di gelatina /genipina**

#### **5.1. Semina e coltura delle ADSC**

Le ADSCs sono state acquistate dall'Invitrogen (numero di catalogo R7788-115, Life Technologies, Monza). Le cellule sono state fatte crescere usando STEMPRO® medium (Gibco, Life Technologies, Monza, con aggiunta di Siero fetale di bovino al 10% (FBS, Gibco, Life Technologies, Monza) e 1% di penicilina/streptomicina, in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> e mantenute a 37°C.

#### **5.2. Scaffold di gelatina /genipina**

La sintesi e caratterizzazione dello scaffold di gelatina/genipina è stata già descritta da Panzavolta ed i suoi collaboratori<sup>224</sup>. In breve, 10 g di gelatina (280 Bloom, Italgelatine SpA, Italia) sono stati solubilizzati in 100 ml di acqua riscaldata a 40°C mantenendo la sospensione sotto agitazione costante per 50 minuti (*Foaming*). Alla soluzione è stato aggiunto il cross-linkante genipina (Wako, Giappone) e la miscela così ottenuta è stata depositata su piastre Petri e lasciata raffreddare a temperatura ambiente per 10 minuti. Infine i campioni sono stati congelati in azoto liquido per circa 10 minuti e liofilizzati.

#### **5.3. Semina delle ADSC negli scaffold di gelatina/genipina**

Le cellule sono state staccate dalle fiasche usando una soluzione di tripsina allo 0.25% e seminate nello scaffold ad una concentrazione di  $5 \times 10^6$  cellule/ml. Il terreno è stato sostituito dopo 3 h dalla semina ed i campioni sono stati

incubati a 37°C in atmosfera umidificata ed il 5% di CO<sub>2</sub>. ed analizzati dopo 7, 14, 21 e 28 giorni di trattamento.

#### **5.4. Saggio di vitalità**

Ad ogni tempo sperimentale, I campioni sono stati trattati per 2 ore con terreno contenente 0.5 mg/ml di (4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolo bromuro (MTT). I Sali di formazano prodotti sono stati solubilizzati in HCl 0.1 N in isopropanolo ed la densità ottica è stata misurata a 570 nm tramite Microplate Reader (Model 680, Biorad LabInc., CA, USA). I dati mostrati rappresentano la media dei valori  $\pm$  deviazione standard di tre esperimenti condotti indipendentemente.

#### **5.5. Differenziamento condrogenico**

Cellule seminate nello scaffold (coltura 3D) e cellule in monostrato (coltura 2D) sono state indotte al differenziamento condrogenico tramite l'utilizzo di un terreno di differenziamento commerciale (STEMPRO VR chondrogenesis differentiation kit, GibcoERL, Life Technologies, Monza, Italia) per 4 settimane. I campioni di controllo erano costituiti da ADSCs seminate in condizione 2D e 3D systems in terreno STEMPRO VR senza l'aggiunta di fattori condrogenici.

#### **5.6. Analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM)**

Ad ogni tempo sperimentale, i campioni sono stati fissati in glutaraldeide al 2.5% (v/v) in tampone fosfato 0.1 M per 2 ore a 4°C e, susseguentemente post-fissati in OsO<sub>4</sub> per un'ora a temperatura ambiente. Dopo diversi lavaggi in tampone fosfato, i campioni sono stati disidratati in alcol a concentrazioni crescenti (50, 70, 90 e 100%) ed inclusi in resina LR white (Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Una volta avvenuta la polimerizzazione della resina, sono state prodotte sezioni fini che, una volta poste su griglie di nichel,

sono state colorate con acetato di uranile e piombo citrato. L'osservazione è stata effettuata tramite un TEM CM10 Philips e le immagini registrate tramite Megaview III digital camera (FEI Company, Eindhoven, Olanda). Alcune sezioni sono state colorate con l'1% di toluidina blu ed osservate al microscopio ottico Eclipse E800 Nikon (Nikon, Tokyo, Giappone).

### **5.7. qRT-PCR (Quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction)**

L'RNA totale è stato estratto dai campioni tramite NucleoSpin RNA I kit (Machery-Nagel, Duren, Germania), e quantificato usando uno spettrofotometro (NanoDropVR ND- 1000 UV-vis, Thermo Scientific, Wilmington, Germania). Il relativo cDNA è stato ottenuto tramite reverse transcriptase SUPRII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e l'espressione dell'mRNA è stata analizzata tramite PCR Real Time (7500 Real Time PCR, Applied Biosystem, Life Technologies, Monza). L'analisi è stata effettuata usando le seguenti sonde: collagene tipo II (COL2A; Hs00264051\_m1), Sox 9 (SOX9, Hs01001343\_g1); aggregano (ACAN, Hs00153936\_m1), e versicano (VCAN, Hs00171642\_m1). L'espressione genica relativa è stata normalizzata all'espressione di GAPDH (Hs 99999905\_m1) ed i dati rappresentati usando la formula del  $2^{-\Delta\Delta CT}$  come raccomandato dal produttore (User Bulletin No.2 P/N 4303859, Applied Biosystems). I valori mostrati rappresentano la media dei valori  $\pm$  deviazione standard di tre esperimenti condotti indipendentemente.

### **5.8. Analisi statistica**

L'analisi statistica dei dati è stata condotta eseguendo un'analisi della varianza seguita da un test di comparazione multipla di Dunnet tramite GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Le differenze statistiche sono state considerate tali con  $P < 0.05$ .



## **6. Incapsulazione di ADSCs in particelle di alginato gelificato tramite ioni Ca/Co come potenziale scaffold funzionale per il differenziamento condrogenico**

### **6.1. Semina e coltura delle ADSC**

Le ADSCs sono state acquistate da una fonte commerciale (Cat. No. PT-5006; Lonza, Basel, Svizzera) e coltivate in terreno Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Life Technologies, Monza) con aggiunta del 10% di FBS e l'1% di penicillina/streptomicina nelle stesse condizioni descritte nel paragrafo 5.1.

### **6.2 .Soluzione di alginato ed incapsulazione cellulare**

Per l'incapsulazione cellulare è stato utilizzato alginato di sodio (Na-alg) ottenuto da alghe brune (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). È stata preparata una soluzione di Na-alg all'1% (p/v) in tampone HEPES 10mM (pH 7.4) filtrata in condizioni sterili tramite un filtro siringa (0.2  $\mu$ m). Le cellule sono state sospese nella soluzione ad una densità di  $2 \times 10^6$  /ml e la sospensione è stata fatta sgocciolare tramite un ago ipotermico 25-gauge (Pic Solution, Como, Italia) all'interno di diversi bagni di gelificazione tutti contenenti una concentrazione 200 mM di  $\text{CaCl}_2$  e concentrazioni decrescenti di  $\text{CoCl}_2$  (10, 5, 2.5, e 1.25 mM). Come controllo è stata utilizzata una soluzione di  $\text{CaCl}_2$  non contenente ioni  $\text{Co}^{+2}$ . I campioni ottenuti sono stati rinominati rispettivamente come Co10, Co5, Co2.5, Co1.25 e controllo in relazione alla concentrazione di  $\text{CoCl}_2$  nei bagni di gelificazione. Le capsule ottenute sono state dapprima lavate in tampone HEPES e poi messe in terreno di coltura DMEM, contenente il 10% di FBS e l'1% di penicillina/streptomicina, e poi incubate a 37°C per 7, 14 e 21 giorni sostituendo il terreno di coltura ogni 3-4 giorni. La morfologia

delle capsule è stata valutata microscopio ottico Nikon Eclipse E800 optical microscope (Nikon, Tokyo, Giappone).

### **6.3. Vitalità cellulare ed analisi istologica**

La vitalità cellulare è stata valutata fino al 21 giorno di coltura usando il saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD Assay kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Le capsule contenenti le cellule sono state incubate per 15 minuti in tampone HEPES contenente calceina AM, un colorante fluorescente che penetra nelle cellule, ed etidio monodimero-1, intercalante del DNA, entrambi alla concentrazione dello 0.1  $\mu$ M. I campioni, poi, sono stati lavati con HEPES ed fotografati tramite microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse E800 microscope, Nikon, Tokyo, Giappone). Il numero di cellule vive (in verde) e morte (in rosso) è stato calcolato tramite ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) e la vitalità cellulare relativa è stata ottenuta dividendo il numero di cellule vitali con il numero totale di cellule (morte + vive). Per l'analisi istologica i campioni sono stati trattati ed inclusi come descritto precedentemente nel paragrafo 5.6. In questo caso le cellule sono state colorate usando toluidina blu all'1% (p/v) ed osservate al microscopio ottico.

### **6.4. qRT-PCR (Quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction)**

Per valutare l'efficienza nella differenziazione delle cellule incapsulate, capsule sono disciolte in una soluzione di sodio citrato 55 mM, EDTA 55mM e NaCl allo 0.9% (p/v). Una volta estratte le cellule, la successiva estrazione del RNA, la formazione di cDNA e la quantificazione dell'espressione dei marker è stata ottenuta con i metodi sopra descritti. In relazione a quest'ultima le sonde TaqMan (Applied Biosystems, Life Technologies) utilizzate sono state: collagene tipo II (COL2A1; Hs00264051\_m1), collagene tipo I (COL1A1;

Hs00164004\_m1), collagene tipo X (COL10A1; Hs00166657\_m1), Sox9 (SOX9; Hs01001343\_g1), versicano (VCAN; Hs00171642\_m1), and HIF-1 $\alpha$  (HIF1A; Hs00153153\_m1).

## **6.5. Analisi statistica**

L'analisi statistica dei dati è stata condotta eseguendo un'analisi della varianza seguita da un test di comparazione multipla di Dunnet tramite GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Le differenze statistiche sono state considerate tali con  $P < 0.05$ .

## **7. Produzione di sistemi microfluidici “low cost” utilizzabili per la produzione di scaffold microparticellari**

### **7.1 Produzione di template tramite microlavorazione**

Per la realizzazione dei template sono state prodotte ed utilizzate diverse resine. La resina epossidica EMAX (Mascherpa S.P.A., Milano, Italia) è stata ottenuta mescolando il prepolimero e l'indurente in rapporto 10:1 (p/p) come riportato dalla ditta. La resina EPON (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) è stata prodotta miscelando Epon\_812 Medium, DDSA, DPM-30 e trietilcitrato in rapporto 5 : 3 : 1 : 1 (p/p/p/p). Prima del loro indurimento, le miscele ottenute sono state degassate in centrifuga a 1500 rpm per 5 minuti. I Materiali Derlin ed il polimetilmetacrilato (PMMA) sono stati ottenuti dalla ditta Du Pont (Du Pont de Nemours Italiana S.r.l, Milano, Italia) ed utilizzati in forma già polimerizzata. I materiali descritti sono stati microlavorati tramite Micro miller MF 70 (Proxxon, Föhren, Germania) e DREMEL 200 (Robert Bosch S.p.a., Milano) utilizzando punte da trapano da 0.8 mm (Proxxon, Föhren, Germania,

Cat. N. NO 28 852) per ottenere canali microfluidici interconnessi sulla base di disegni progettuali ottenuti tramite un software freeware (Blender 2.69).

## 7.2. Fabbricazione dei microchip

I template sono stati utilizzati come stampo per la realizzazione di master, tramite la tecnica replica molding<sup>225</sup>. I master sono stati prodotti utilizzando dispersioni di agarosio a diverse concentrazioni (2-4% p/v in acqua o in una miscela di acqua/etanolo) fatte colare sulla superficie lavorata dei template e lasciate gelificare per 3 ore a 4°C. Dopo una completa consolidazione, i master sono stati separati delicatamente dai template ed immersi in diversi solventi quali etanolo, glicerolo, PEG 200, PEG 600 ed una miscela di etanolo glicerolo 50/50 (v/v). in modo da ottenere un restringimento controllato dei canali in rilievo tramite disidratazione. La tecnica del *replica molding* è stata sfruttata anche per ottenere repliche contenenti canali microfluidici utilizzando prepolimeri epossidici (EPON) o siliconici (PDMS Sylgard 184 e Silastic E RTV, Siliconi Padova Sas, Padova) i quali, una volta colati sui master di agarosio, sono stati lasciati a consolidare per 3 giorni a temperatura ambiente.

L'aggiunta di connessioni per l'entrata/uscita di liquidi nei canali microfluidici è stata ottenuta tramite piccole modificazioni di procedure già descritte in letteratura<sup>226-228</sup>. Brevemente, le estremità dei canali sono state forate usando un trapano Dremmel ed a questo livello sono stati posti dei tubi in FEP (etilene-propilene fluorurato, 1/16" OD, 0.75 mm ID, and 3/16" OD, 2.25 mm ID, VWR International S.r.l., Milano, Italia) oppure aghi ipodermici (21 gauge, Pic Solution, Como, Italia). I canali, ancora aperti, sono stati infine, sigillati irreversibilmente ponendo le repliche su una sottile lastra (*slab*) di resina (epossidica o siliconica a seconda del materiale di partenza) parzialmente

consolidata e, poi, lasciata indurire a temperatura ambiente. Le valutazioni morfologiche e dimensionali dei chip prodotti è stata effettuata tramite l'utilizzo di uno stereo microscopio ottico (Nikon Phase Contrast ELWD 0.3 and Nikon SMZ 1500, Nikon, Tokyo, Giappone) e le immagini sono state analizzate tramite EclipseNet, (Nikon, versione 1.16.5) ed ImageJ software.

### **7.3. Validazione dei microchip: produzione di microparticelle di cellulosa acetato**

La validazione dei microchip prodotti è stata ottenuta con la produzione di microparticelle polimeriche di cellulosa acetato (CA) tramite la tecnica di evaporazione del solvente<sup>229</sup>. In breve, è stata utilizzata una soluzione di CA al 15% (p/v) in una miscela di etilacetato ed acetone 4:1 (v/v) come fase oleosa (OP) mentre come fase acquosa (WP) una soluzione di Carbopol (Sigma Aldrich) allo 0.5% (p/v). Entrambe le fasi sono state caricate all'interno di siringhe da 10 ml (Pic Solution, Como, Italia) ed introdotte a velocità variabili all'interno di un chip a geometria flow focusing (FF)<sup>230</sup> tramite una pompa siringa. La velocità di flusso della OP (canale centrale) era compresa fra 80 e 250  $\mu\text{l}/\text{min}$  mentre la velocità di flusso della WP (canali laterali) variava fra i 3.0 and 4.5  $\text{ml}/\text{min}$ . In queste condizioni si ottenevano gocce monodisperse di OP che una volta consolidate, previa evaporazione della miscela di etilacetato ed acetone, formavano microoparticelle di CA. La dimensione e la morfologia delle particelle è stata valuta tramite microscopia ottica e le immagini sono state analizzate tramite EclipseNet, ed ImageJ.

## Risultati e Discussione

### 8. Valutazione dell' efficienza di differenziamento in senso condrogenico di ADSC seminate su uno scaffold di gelatina /genipina

La prima parte del lavoro di tesi è stata incentrata sullo studio della capacità di uno scaffold biomimetico di gelatina reticolato con genipina (GNP) di indurre un differenziamento condrogenico su ADSC umane. La realizzazione dello scaffold, l'analisi strutturale, le proprietà meccaniche e la cinetica di degradazione sono state descritte da Panzavolta ed i suoi collaboratori<sup>224</sup>.

La gelatina è una proteina denaturata ottenuta dall' idrolisi parziale del collagene. È un materiale utilizzato da tempo nelle preparazioni farmaceutiche e cosmetiche così come nell'industria alimentare in quanto è da sempre considerata una molecola "sicura" (classificata come sostanza *GRAS*, *generally regarded as safe*, dalla FDA statunitense). La gelatina, ha suscitato l'interesse di vari gruppi di ricerca nell'ambito del TE, per via della presenza all'interno della sua struttura della sequenza amminoacidica RGD (arginina-glicina-Acido aspartico), implicata nella regolazione della adesione e, ricognizione cellulare <sup>231</sup>. Inoltre, i suoi prodotti di degradazione sono ben tollerati dall'organismo, è facilmente reperibile ed è economicamente più vantaggiosa rispetto agli altri materiali di derivazione animale come lo stesso collagene o i tessuti decellularizzati<sup>232, 233</sup>.

La genipina è l'aglicone derivato dall'iridoide glicoside geniposide presente nel frutto di *Gardenia jasminoides*.

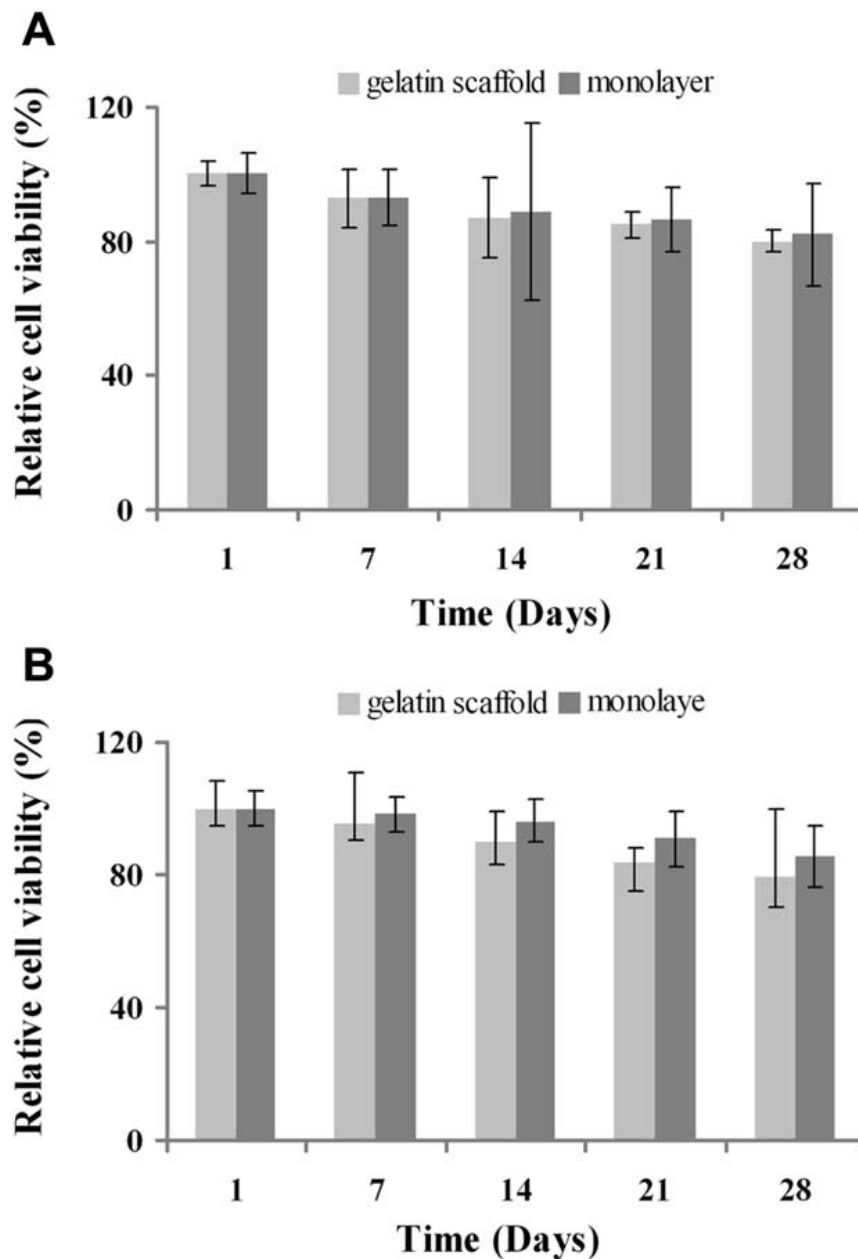


Figura 8.1 Vitalità delle cellule trattate con (A) and senza (B) terreno condrogenico per 1, 7, 14, 21, e 28 giorni su gelatina/GNP o in monostrato. Ogni esperimento è stato svolto in triplicato ed espresso come media percentuale  $\pm$  deviazione standard.

È ottenuto tramite idrolisi enzimatica della genipa ad opera della  $\beta$ -glucosidasi.

La sua peculiarità è quella di essere 5000–10,000 volte meno tossica della glutaraldeide, molecola largamente usata nella reticolazione della gelatina<sup>234</sup>.

Il saggio dell'MTT mostra un'alta vitalità delle cellule seminate su scaffold sia in presenza che in assenza di terreno arricchito con fattori condrogenici. I valori sono comparabili a quelli delle cellule fatte crescere in monostrato il che

dimostra un'alta biocompatibile del materiale (figura 8.1). Le immagini al microscopio ottico mostrano una buona adesione cellulare a partire dalla prima settimana (figura 8.2); il grado di infiltrazione e proliferazione all'interno dei pori aumenta col passare delle settimane fino ai 28 giorni di trattamento. Questo dato è indice di elevata conducibilità del biomateriale, un parametro vitale per l'applicazione nel campo dell'ingegneria tissutale<sup>235</sup>. Le immagini TEM confermano la stretta aderenza cellulare sulla superficie del materiale. Le cellule al termine della prima settimana sono caratterizzate da un'intensa sintesi proteica, come rilevato dalla presenza di un reticolo endoplasmatico rugoso molto sviluppato, anche se non accompagnata dalla produzione di matrice extracellulare da parte delle ADSCs (figura 8.3 A). Dopo 2 settimane di differenziamento, sono visibili nello spazio extracellulare alcune strutture fibrillari disposte in maniera casuale riconducibile ad un'iniziale deposizione di ECM (figura 8.3 B) la quale risulta più pronunciata dopo 21 giorni di coltura (figura 8.3 C). Alla fine della quarta settimana la ECM prodotta è caratterizzata un'elevata organizzazione con fibrille orientate perpendicolarmente e orizzontalmente (figura 8.3 D e inserto). Le ADSCs nello scaffold trattate con terreno privo di fattori condrogenici non mostrano alcuna secrezione proteine extracellulari per tutto il periodo di coltura così come le cellule poste in monostrato e incubate con terreno condrogenico (figura 8.3 E, F) Il risultato di questa analisi è in accordo con lo studio condotto da McAlinden ed i suoi collaboratori dove l'ECM della cartilagine è descritta come a network di fibrille di diverso diametro costituite principalmente da collagene di tipo II<sup>236</sup>.



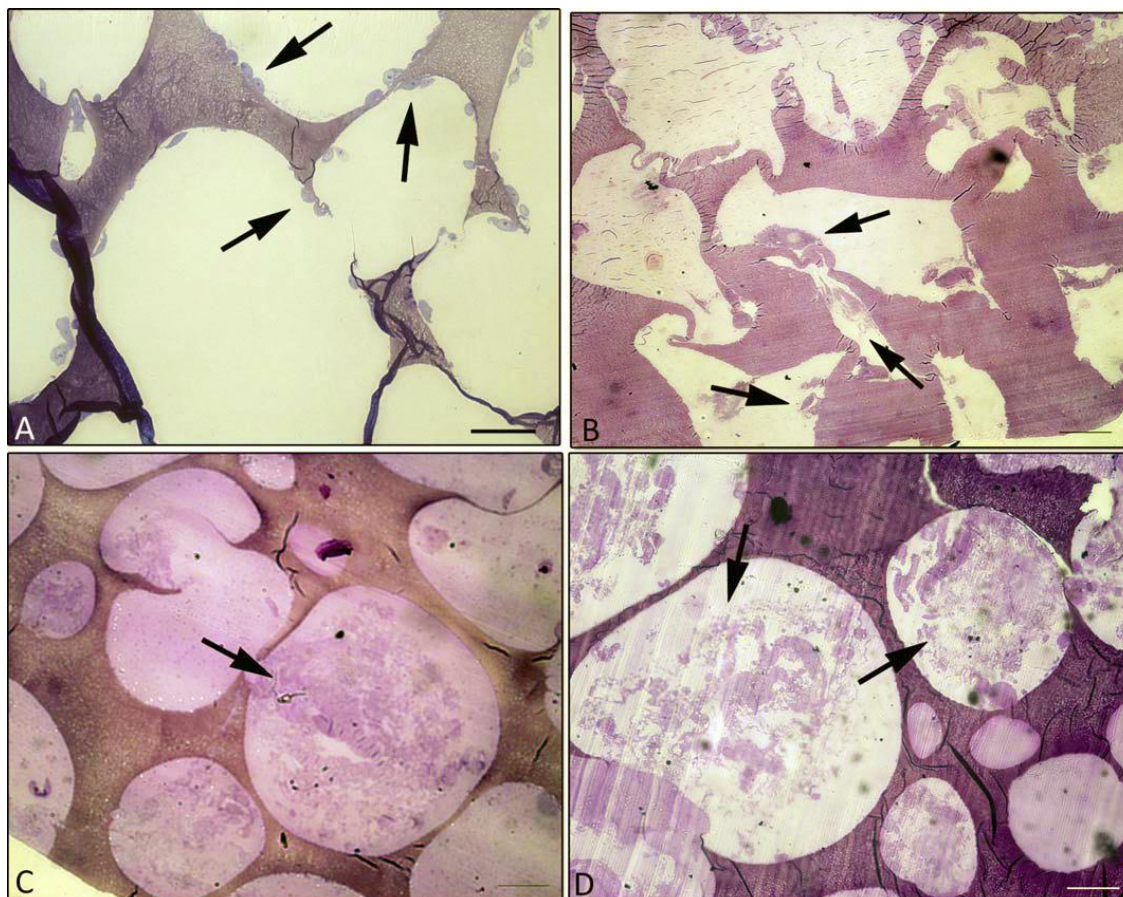


Figura 8.2. ADSCs cresciute in scaffold di gelatina/GNP per (A) 1, (B) 2, (C) 3, e (D) 4 settimane. In tutte le immagini la barra corrisponde a 50  $\mu$ m. Le frecce nere indicano le cellule.

Le analisi in qRT-PCR mostrano un aumento dell'espressione di mRNA di Sox9, ACAN e VCAN subito dopo la prima settimana di coltura 3D mentre il segnale relativo all'espressione di Col2A1 rimane basso e pressoché costante (figura 8.5). In particolare l'aumento di Sox9 è di circa 4.5 volte al termine dei 7 giorni (dato in accordo con la precoce espressione di Sox9 durante il differenziamento condrogenico *in vivo* <sup>237</sup>) diminuendo nelle settimane successive. In ogni caso, la sua espressione è sempre statisticamente maggiore rispetto a quella delle cellule coltivate in monostrato (Figura 8.4 B).

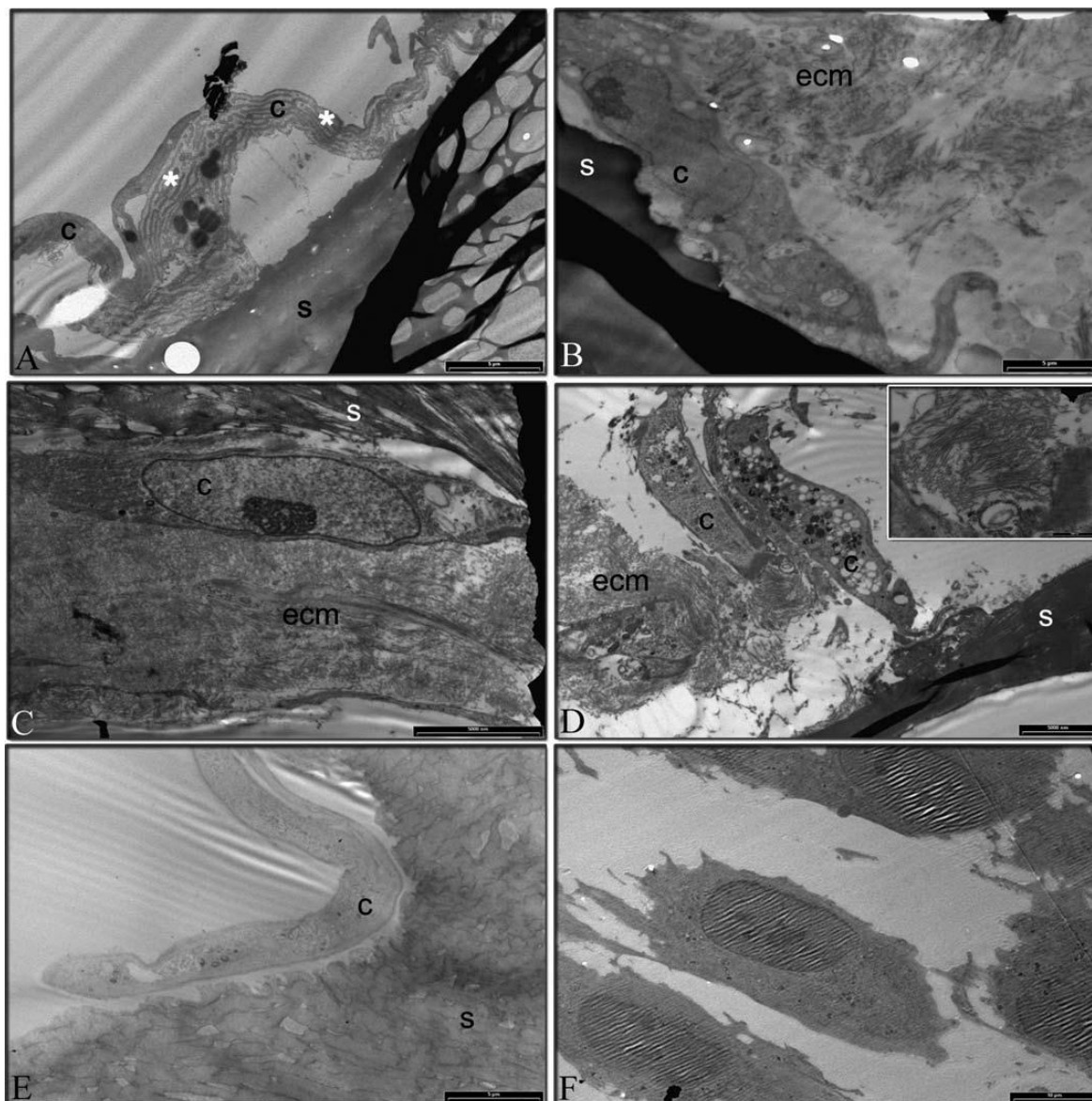


Figura 8.3. Immagini al TEM di hADSCs seminate sullo scaffold e trattate con fattori differenziativi a diversi tempi sperimentali. A: 7 giorni; B: 14 giorni; C: 21 giorni; D: 28 giorni. E: hADSCs seminate sullo scaffold senza fattori di differenziamento dopo 28 giorni di coltura; F: hADSCs in monolayer dopo trattamento con fattori differenziativi al termine dei 28 giorni di coltura. Barre A-E: 5  $\mu$ m; Barra D inserto: 1  $\mu$ m; Barra F: 10  $\mu$ m.

Questo dato è riscontrato sia in assenza che in presenza di fattori differenziativi il che suggerisce che lo scaffold stesso, anche se in maniera blanda, sia in grado di promuovere l'aumento dell'espressione di Sox9 (figura 8.4 A).

L'espressione di ACAN mostra un picco dopo 2 settimane di coltura seguita da una riduzione marcata per tempi lunghi di coltura (figura 8.4 B) mentre l'espressione di VCAN aumenta di circa 3 e 4 volte dopo rispettivamente 1 e 3 settimane di trattamento e diminuisce nella quarta settimana (figura 8.5 A).

Anche l'espressione di questi due marker è sempre statisticamente differente rispetto a quella delle cellule coltivate in monolayer. Considerando l'espressione di Coll2A1, i dati di qRT-PCR mostrano un'alta espressione nelle cellule nello scaffold mentre nessun segnale è evidente nelle cellule in monostrato, questo sia in presenza che in assenza di terreno differenziante.

Complessivamente, le indagini in qRT-PCR indicano una certa potenzialità dello scaffold nell'indurre differenziamento condrogenico; in tutti i campioni, comparando l'espressione dell'mRNA delle cellule nei sistemi 2D e 3D, si nota un'up-regulation di Col2A1, Sox9, ACAN e VCAN nelle cellule fatte crescere nello scaffold, tale aumento di espressione è più marcato in combinazione con terreno di coltura specifico per il differenziamento condrogenico. Questo suggerisce che lo scaffold è idoneo allo scopo di produrre cartilagine ingegnerizzata ma per esplicitare al meglio la sua azione ha bisogno della presenza contemporanea di fattori differenziali. Tuttavia è possibile che il potenziale differenziativo, seppur blando, della matrice di gelatina/genipina possa innescare un'iniziale produzione di cellule e matrice cartilaginee e che, una volta impiantato nell'organismo, sia in grado di sfruttare il pool di molecole presenti a livello della lesione in modo da permettere la neoformazione di cartilagine.

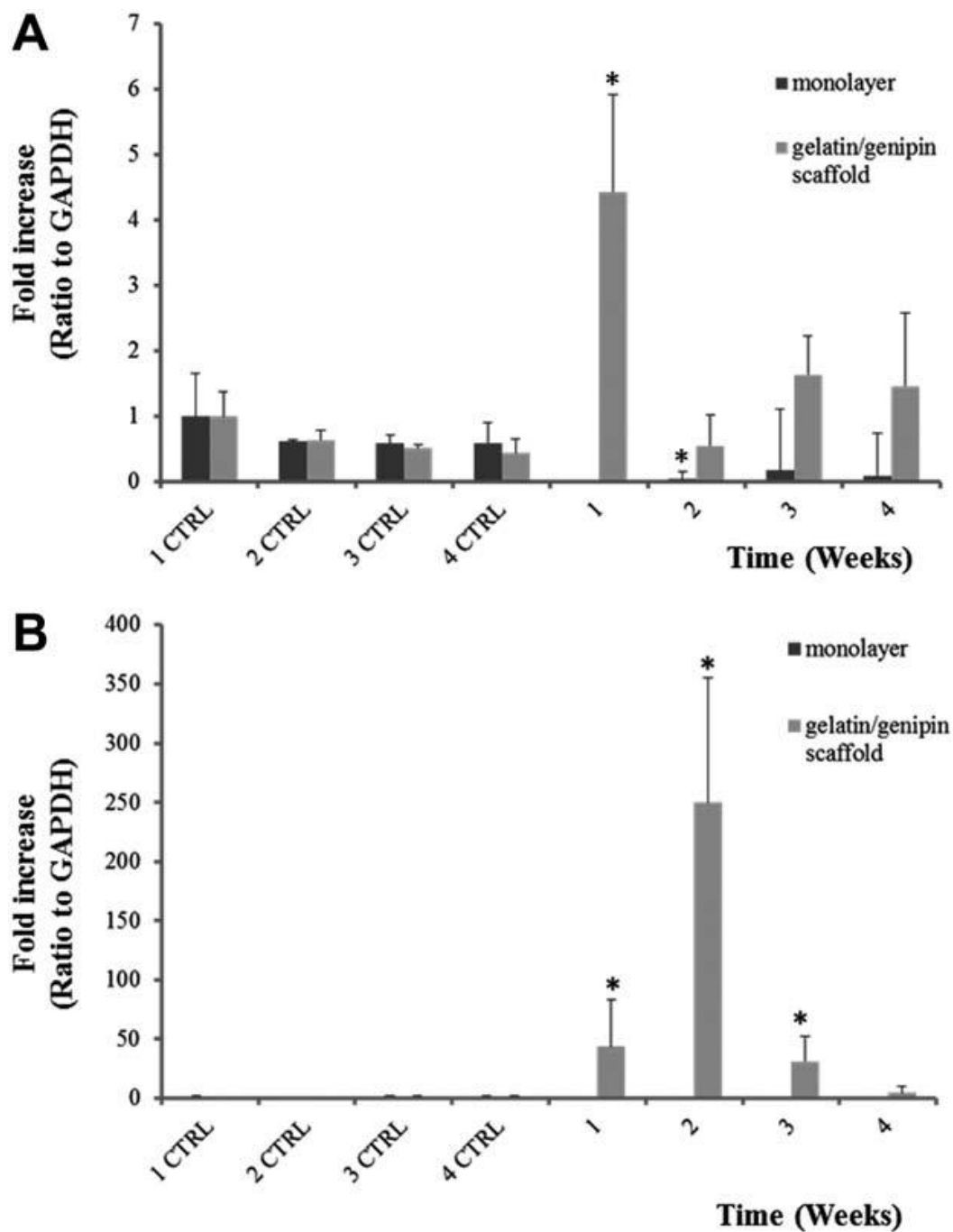


Figura 8.4. Analisi dell'espressione genica di A: Sox9 e B: ACAN. L'espressione dei marker è stata calcolata come valore relativo rispetto all'espressione delle hADSC seminate in monolayer dopo una settimana di coltura e normalizzate sul livello di espressione della GAPDH. \*Differenza significativa ( $p < 0.05$ ).

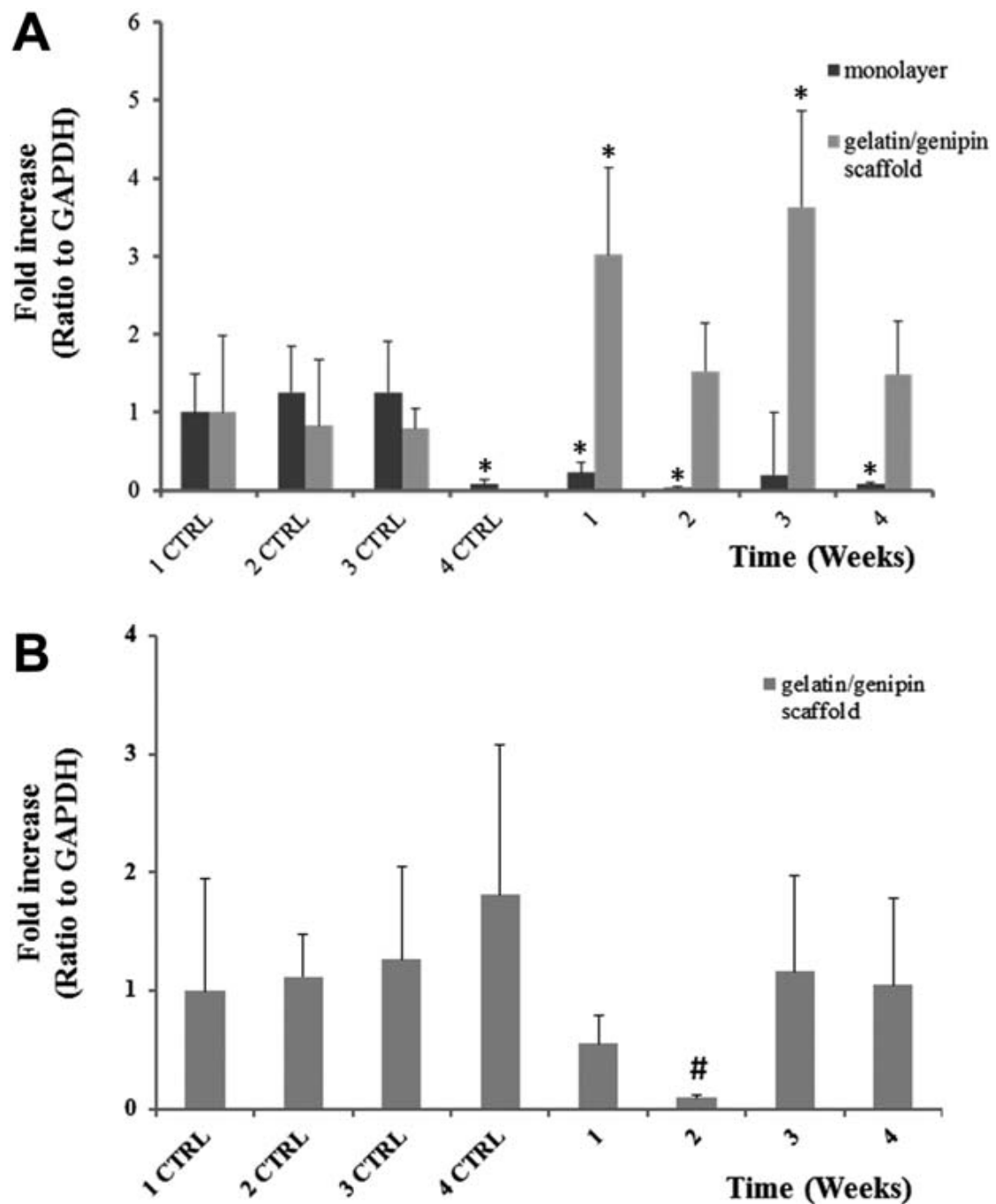


Figura 8.5. Analisi dell'espressione genica di A: VCAN e B: Col2A1. L'espressione dei marker è stata calcolata come valore relativo rispetto all'espressione delle hADSC seminate in monolayer dopo una settimana di coltura e normalizzate sul livello di espressione della GAPDH. \*Differenza significativa ( $p < 0.05$ )

## **9. Incapsulazione di ADSCs in particelle di alginato gelificato tramite ioni Ca/Co come potenziale scaffold funzionale per il differenziamento condrogenico**

Diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato che è possibile differenziare in senso condrogenico le MSC mantenendole in condizioni ipossiche in modo da mimare l'ambiente fisiologico della cartilagine <sup>238 239</sup>. Infatti, la cartilagine articolare è un tessuto avascolare ed il suo fabbisogno di ossigeno è garantito tramite la diffusione di quest'ultimo dai tessuti subcondrali e dal liquido sinoviale; questo fa sì che la tensione dell'ossigeno non sia mai superiore al 2-7% <sup>240 241</sup>. Inoltre, condizioni ipossiche si riscontrano anche durante la crescita epifisaria, dove tale ambiente garantisce la formazione di condrociti da parte delle MSC naturalmente presenti a questo livello <sup>242</sup>. Il meccanismo molecolare coinvolto in condizioni di bassa tensione di ossigeno è regolato dal complesso trascrizionale *hypoxia inducible factor 1 (HIF-1)* formato da 2 subunità: HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ . In condizioni normali, HIF-1 $\alpha$  viene velocemente degradato dal complesso delle prolin-idrossilasi (PHDs) e dal fattore inibente HIF (FIH) mentre a basse concentrazioni di ossigeno questi due fattori sono inibiti permettendo a HIF-1 $\alpha$  di dimerizzare con HIF-1 $\beta$ , traslocare nel nucleo ed attivare la trascrizione di geni target fra i quali i geni peculiari della cartilagine <sup>239, 243, 244</sup>. L'up-regulation di HIF-1 può essere ottenuta anche chimicamente utilizzando i cosiddetti *hypoxia mimicking agents* fra i quali abbiamo il Co<sup>+2</sup>. La caratteristica degli ioni cobalto nell'indurre ipossia chimica è dovuta alla sua capacità di inibire FIH sostituendosi al Fe<sup>+2</sup> a livello *iron-binding center* dell'enzima stesso

<sup>245 246</sup>.

In ogni caso, l'attivazione su HIF-1 non è sufficiente per ottenere un completo differenziamento condrogenico delle MSC in quanto, come già visto, è necessario anche l'utilizzo di un supporto strutturale che garantisca una tridimensionalità del sistema. Alcuni esempi di materiali utilizzati a tale scopo sono stati descritti nel paragrafo 4.2.2. Oltre a questi, l'alginato ha riscontrato un notevole interesse.

L'alginato è un etero-polisaccaride che viene estratto dalle alghe brune; esso è composto da residui di  $\beta$ -D-mannuronato e  $\alpha$ -L-guluronato ed ha la caratteristica di formare idrogel in presenza di ioni bivalenti (come  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$  e  $\text{Co}^{+2}$ ), tramite la loro interazione con residui di  $\alpha$ -L-guluronato di due distinte catene polimeriche <sup>247 248</sup>. Numerosi studi hanno dimostrato che l'alginato provvede a mantenere un ambiente ideale per le cellule facilitandone la distribuzione spaziale e permettendo di ottenere un'organizzazione strutturale che ricalca quella della cartilagine articolare, in aggiunta, è stato dimostrato che questo biomateriale ha un effetto condroinduttivo in quanto promuove la sintesi di componenti della matrice cartilagine-specifici <sup>249 250 251</sup>.

Sulla base di quanto descritto, in questa parte del lavoro di tesi è stato messo a punto un sistema per migliorare il differenziamento delle hADSC tramite il loro incapsulamento in particelle di alginato il cui cross-linking è stato ottenuto utilizzando ioni  $\text{Co}^{+2}$ . Questa strategia ha permesso una notevole riduzione dei costi rispetto alle procedure convenzionali in quanto il differenziamento è avvenuto in assenza di fattori di crescita e differenziativi come TGF $\beta$ s e BMPs. Sempre con lo scopo di sfruttare sistemi *low-cost*, le capsule sono state prodotte tramite la tecnica *dripping* (metodo ad estrusione) descritta nel paragrafo 6.2 in cui delle gocce di una dispersione hADSC/alginato sono state fatte sgocciolare in un bagno di gelificazione contenente  $\text{CaCl}_2$  e diverse

concentrazioni di  $\text{CoCl}_2$ . Questo è un metodo largamente utilizzato per la produzione di capsule e particelle per via della sua semplicità di configurazione e perché non necessita di strumentazioni dedicate<sup>252 253</sup>.

Per quanto riguarda la morfologia, le condizioni sperimentate durante la produzione degli scaffold garantiscono la formazione di capsule di forma sferica e regolare comprese in un range dimensionale ristretto, due parametri fondamentali per quanto riguarda il controllo di qualità delle colture in matrici tridimensionali<sup>252</sup>. Infatti, come si può vedere in figura 9.1 e 9.2, il diametro medio delle capsule contenenti  $\text{Co}^{+2}$  è compreso fra i  $789 \pm 52$  to  $826 \pm 74 \mu\text{m}$  in linea con il valore delle capsule di controllo ( $810 \pm 36 \mu\text{m}$ ). Inoltre, le immagini al microscopio ottico evidenziano una distribuzione uniforme delle cellule dopo 2 ore dalla produzione delle capsule (figura 9.1). Macroscopicamente, le particelle mostrano una superficie liscia e mantengono la loro sfericità durante i 21 giorni di coltura senza evidenti segni di degradazione (figura 9.2). Questi dati suggeriscono che le diverse concentrazioni di  $\text{CoCl}_2$  nel bagno di gelificazione non influiscono sulle dimensioni particellari ed il metodo di produzione utilizzato è riproducibile ed idoneo a tale scopo.



Il grado di tossicità del cobalto è stato determinato empiricamente calcolando la vitalità cellulare relativa. (figura 9.3). Il rapporto fra ADSC vive (in verde) e morte (in rosso) nei campioni 1.25Co e 2.5Co non differisce significativamente rispetto

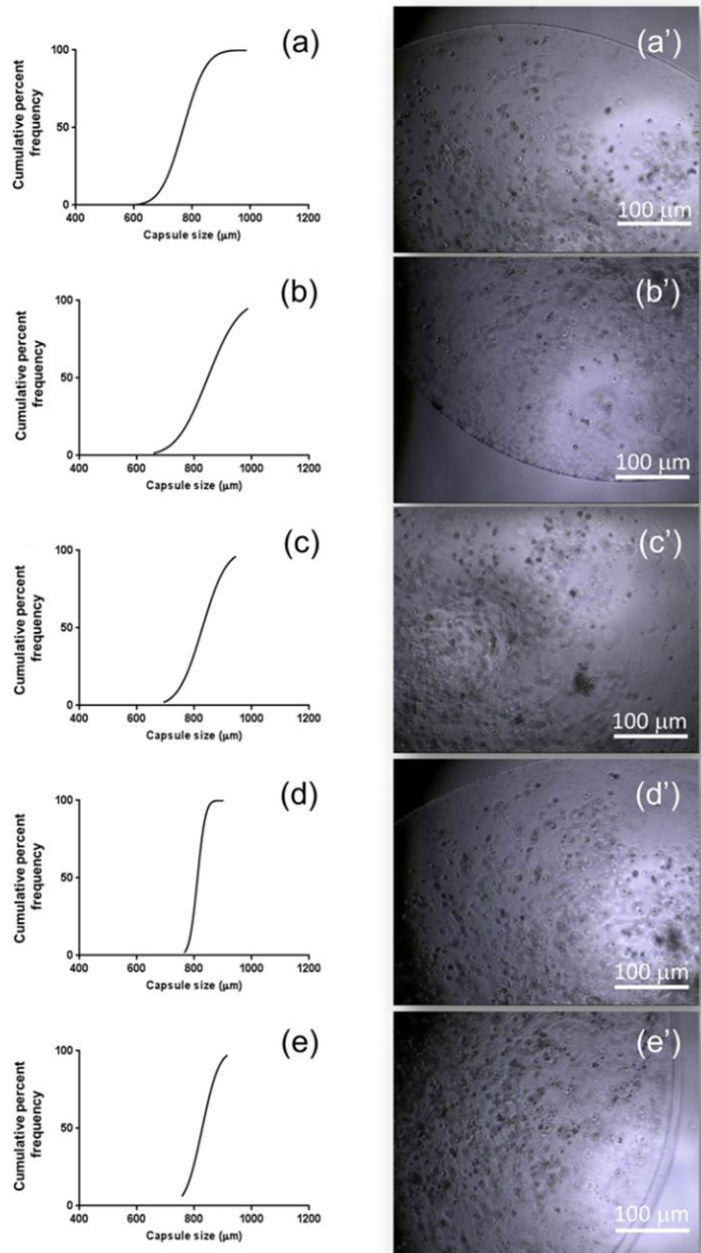


Figura 9.1. Distribuzione dimensionale cumulativa (a–e) e immagini microscopiche (a'–e') delle capsule di Ca/Co alginato contenenti hADSCs dopo 2 h dalla preparazione. (a), (a') Controllo; (b), (b') Campione Co1.25; (c), (c') Campione Co2.5; (d), (d') Campione Co5; (e), (e') Campione Co10. Il diametro medio delle capsule è: controllo,  $810 \pm 36 \mu\text{m}$ ; Co1.25,  $821 \pm 98$ ; Co2.5,  $789 \pm 52$ ; Co5,  $826 \pm 74 \mu\text{m}$  e Co10,  $804 \pm 16 \mu\text{m}$ .

alle cellule del controllo nell'arco dell'intero periodo di coltura (sebbene tale rapporto sia leggermente più basso nei campioni 2.5Co) confermando , in questo caso, che le concentrazioni di  $\text{Co}^{+2}$  presenti nel bagno di gelificazione sono ben tollerate dalle cellule. La vitalità cellulare in 5Co è simile al controllo nei primi 7 giorni di coltura diminuendo al termine di due settimane 2 settimane fino a essere statisticamente più bassa dopo 21 giorni, questo dato indica che tali condizioni di coltura non sono ideali per effettuare studi a lungo termine. Infine, la percentuale di cellule vive del Co10 è di circa il 40% appena dopo la prima settimana di coltura ed il numero di cellule vive tende a diminuire con il tempo, comportamento ascrivibile ad una tossicità acuta degli ioni  $\text{Co}^{+2}$  ad elevate concentrazioni (figura 9.3).

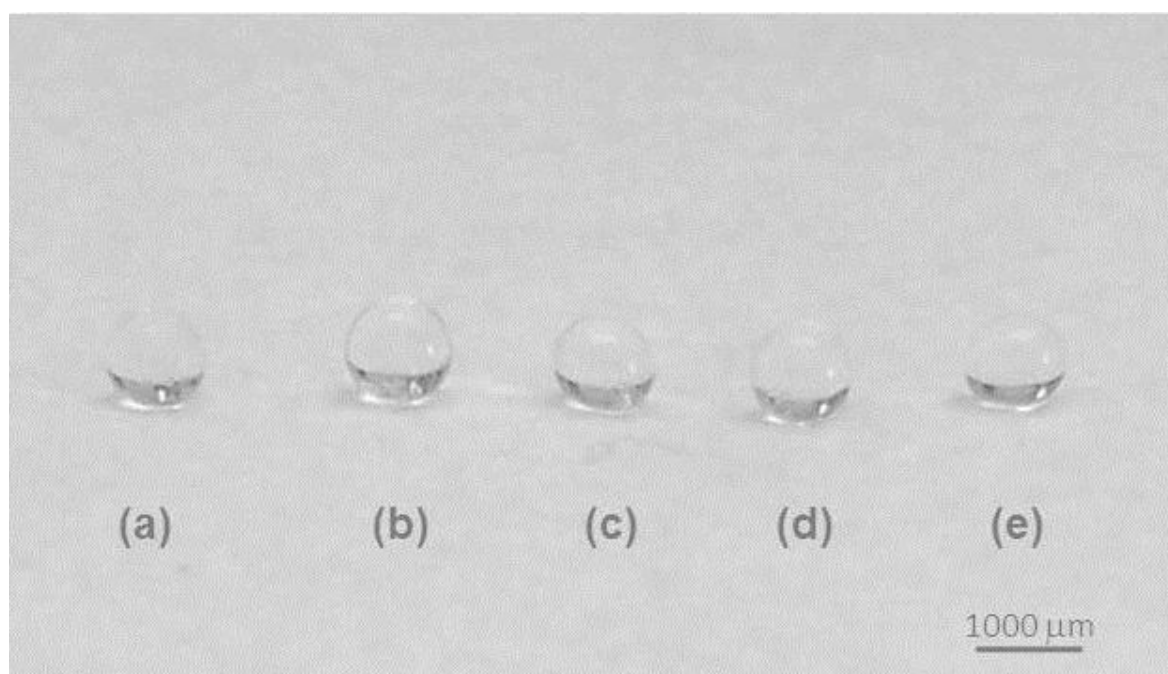


Figura 9.2. Capsule di Ca/Co alginato contenenti hADSCs dopo 21 giorni di coltura. (a) Controllo; (b) Co1.25; (c) Co2.5; (d), Co5; (e) Co10.

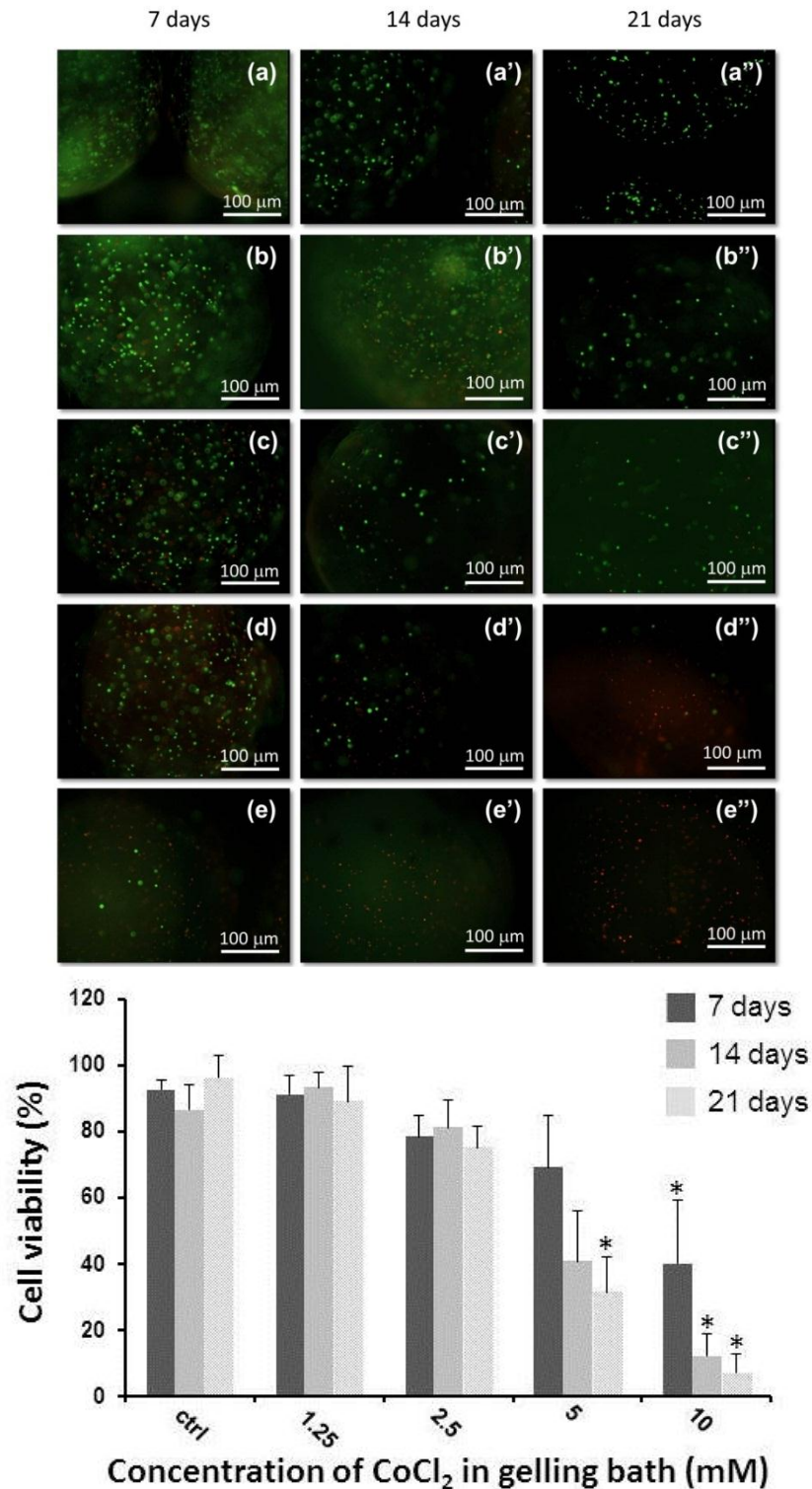


Figura 9.3. Colorazione Live/dead (verde/rosso) di hADSCs all'interno di capsule di Ca/Co alginato. (a), (a'), (a'') Controllo; (b), (b'), (b'') Co1.25; (c), (c'), (c'') Co2.5; (d), (d'), (d'') Co5; (e), (e'), (e'') Co10. (f) Vitalità delle hADSC all'interno delle capsule (cellule vive/cellule vive + cellule morte). Barra nera: 7 giorni di coltura; barra grigio scuro: 14 giorni di coltura; barra grigio chiaro: 21 giorni di coltura. I valori indicano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 differenti esperimenti. \* Indica una differenza significativa rispetto al controllo ( $P < 0.05$ ).

E' importante notare che esiste un equilibrio fra la concentrazione di  $\text{Co}^{+2}$  nel bagno di gelificazione e la concentrazione all'interno delle capsule di alginato. In questo caso si presume che la quantità di ioni cobalto all'interno dell'alginato sia minore rispetto a quella presente nel bagno di gelificazione e questo permette la sopravvivenza e il differenziamento delle cellule; inoltre, l'interazione fra  $\text{Co}^{+2}$  ed gruppi carbossilici dell'alginato fa sì che lo scaffold funga da reservoir di ioni, i quali sono rilasciati in maniera lenta e costante presumibilmente con una cinetica di ordine 0. In ogni caso, sono necessari successivi studi per valutare in maniera più precisa la reale concentrazione di cobalto all'interno delle capsule.

Il grado di differenziamento condrogenico è stato valutato monitorando l'espressione di HIF-1, marker di cartilagine ialina (collagene di tipo II. Sox9 e versicano) e marker di cartilagine ipertrofica (collagene tipo X). I profili di espressione genica dei controlli mostrano un picco dell'espressione Sox9 dopo 14 giorni di coltura seguito da una diminuzione dopo 21 giorni; l'espressione del COL2 e HIF-1 diminuisce dopo 14 e 21 giorni mentre quella del versicano rimane inalterata (figura 9.4) L'espressione genica di HIF-1 risulta di particolare interesse in quanto, come descritto in precedenza, è il mediatore predominante della risposta ipossica ed è stato dimostrato che gli ioni  $\text{Co}^{+2}$ , oltre ad agire sul FIH, riescono indirettamente anche a stimolare la sintesi di mRNA di HIF-1 <sup>245</sup>. Nel nostro caso, i livelli d' espressione dell'mRNA di HIF-1 aumentano dopo 7 giorni nei campioni Co2.5 e Co5 diminuendo costantemente nei successivi tempi sperimentali (figura 9.4 (b), (c)). Questo risultato è indice di un meccanismo a feed-back negativo di HIF-1 che si ha in condizioni di ipossia prolungata. Sempre nei campioni Co2.5 e Co5, l'espressione di Sox9 aumenta continuamente fino a 21 giorni mentre i livelli di espressione del versicano più

alti soltanto nei campioni Co5 e Co10 (figura 9.4 (b), (c); (d)). I marker appena descritti hanno un ruolo centrale durante le fasi iniziali della condrogenesi:

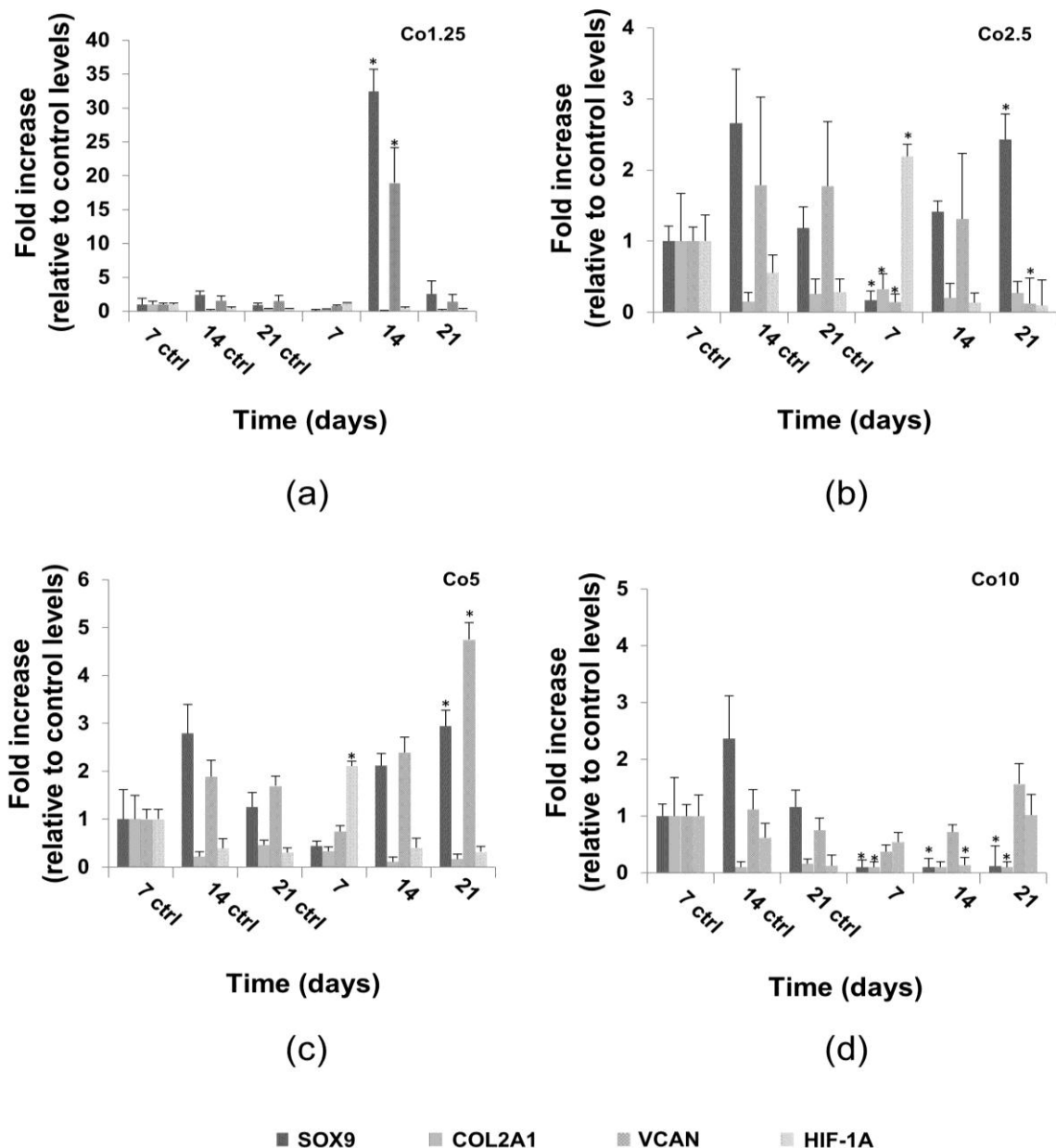


Figura 9.4. Analisi qRT-PCR di hADSCs all' interno di capsule di Ca/Co alginate. I livelli di espressione dei geni marker sono stati normalizzati a quelli di GAPDH e calcolati rispetto ai livelli di espressione delle cellule nelle capsule di controllo dopo 7 giorni di coltura. I valori indicano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 differenti esperimenti. \* Indica una differenza significativa rispetto al controllo ( $P < 0.05$ ). VCAN: versicano.

Sox9 è un fattore di trascrizione che regola la condensazione cellulare e la produzione di altri fattori condrogenici fra i quali il collagene di tipo II<sup>254 255</sup>,

mentre il versicano è un proteoglicano presente sulla superficie della cartilagine ed è coinvolto nella regolazione fenotipica delle cellule cartilaginee<sup>256 257</sup>.

Nei campioni Co1,25 non è stata osservata nessuna variazione dell'espressione di HIF-1 rispetto ai dati di controllo (figura 9.4 (a)) sebbene si riscontri un forte aumento dell'mRNA di Sox9 e versicano dopo 14 giorni. Tale comportamento è stato attribuito al fatto che la concentrazione di  $\text{Co}^{+2}$  era insufficiente a promuovere il differenziamento e, quindi, l'aumento dell'espressione di Sox9 e versicano è da attribuirsi alla sola azione da parte dell'alginato. La forma sferica delle cellule all'interno delle capsule e la loro localizzazione in spazi dedicati (o lacune) dimostrano la capacità dei campioni Co2,5 e Co5 di promuovere un iniziale differenziamento al termine dei 21 giorni di coltura. Insieme alla presenza di numerose lacune si può notare anche deposizione di una matrice proteoglicanica. La deposizione di matrice extracellulare invece non si osserva nei campioni Co1,25, in accordo con i dati di qRT-PCR, così come la morfologia irregolare delle cellule in Co10 è indice di sofferenza dovuta all'elevata concentrazione di cobalto (figura 9.5). Il collagene di tipo II si rileva soltanto a bassi livelli: anche se questo è un componente fondamentale della ECM cartilaginea, la sua espressione può richiedere più di 21 giorni, a seconda delle condizioni di coltura utilizzate<sup>251</sup>.

Comunque, calcolando il rapporto fra i valori di espressione Col2A1/Col1A1 (figura 9.6) si può notare che i campioni Co2,5 e Co5 possono essere considerati i candidati migliori per promuovere il differenziamento condrogenico. Infatti, in entrambi i casi, l'espressione di COL2A1 è circa 50 volte più elevata rispetto a quella di COL1A1 dopo 3 settimane.

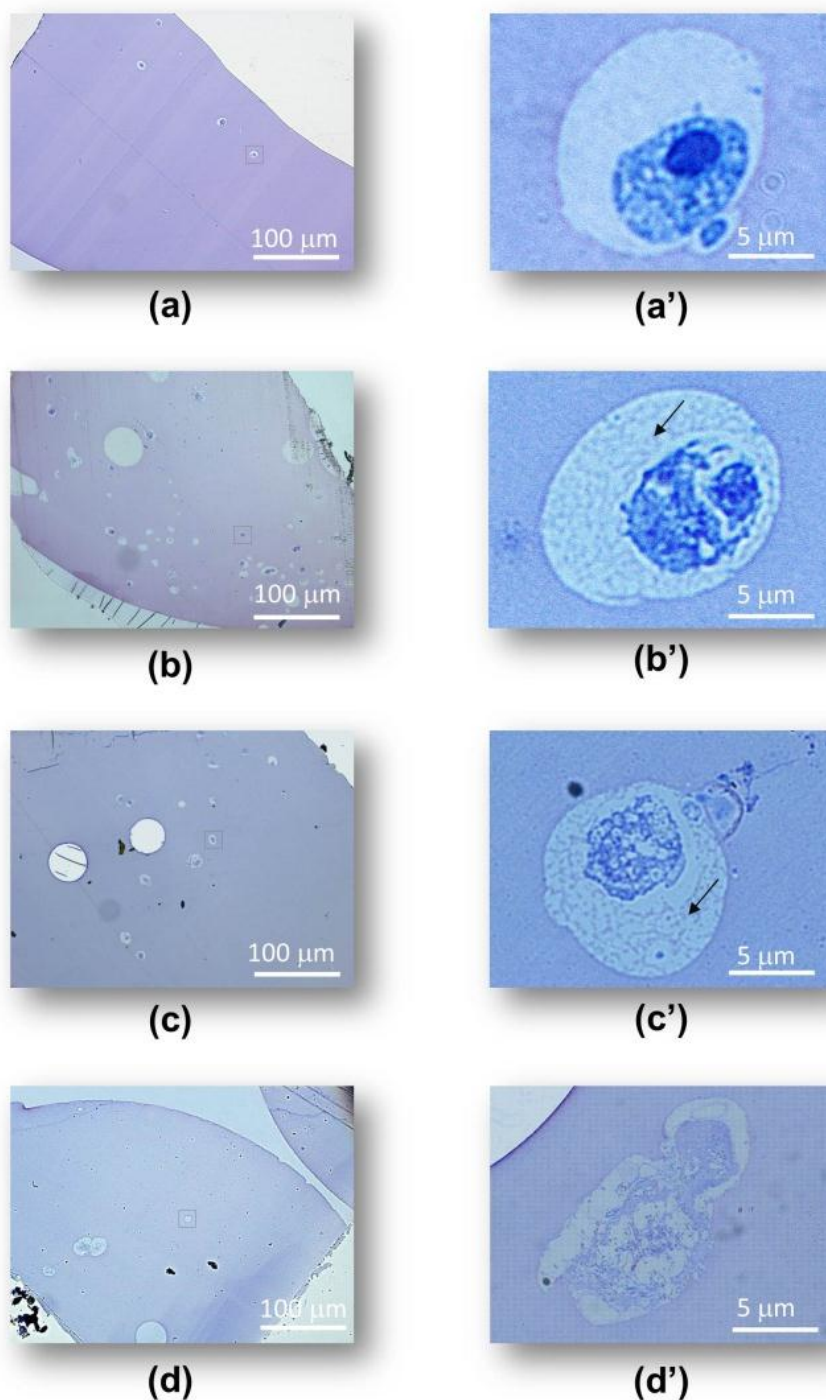


Figura 9.5. Immagini microscopiche di hADSCs incapsulate in Ca/Co alginato colorate con blu di toluidina dopo 21 giorni di coltura. (a), (a') Co1.25; (b), (b') Co2.5; (c), (c') Co5; (d), (d') Co10. Le frecce nere indicano la deposizione di matrice proteoglicanica. I riquadri neri indicano le lacune

Tuttavia, per valutare la reale capacità di sintesi di COL2A1, sono indispensabili ulteriori studi a lungo termine. Infine è stata misurata l'espressione del collagene di tipo X (figura 9.7), un marker peculiare di condrociti ipertrofici che nel tempo, andranno incontro a differenziamento

osteogenico<sup>258 259</sup>. In questo studio, l'espressione di collagene di tipo X è molto bassa in tutti i campioni ed è comparabile con i valori di controllo; tale risultato evidenzia la capacità delle capsule di mantenere il differenziamento delle hADSC nello stato di condrociti o condroprogenitori senza che queste possano andare in contro a osteogenesi nel tempo.

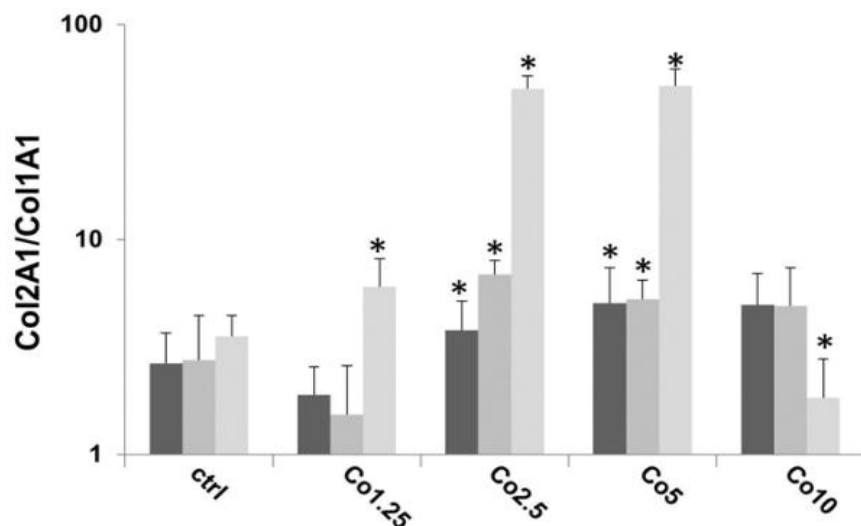


Figura 9.6. Rapporto Col1A1/Col1A2 della quantità di mRNA sintetizzato dalle cellule incapsulate.

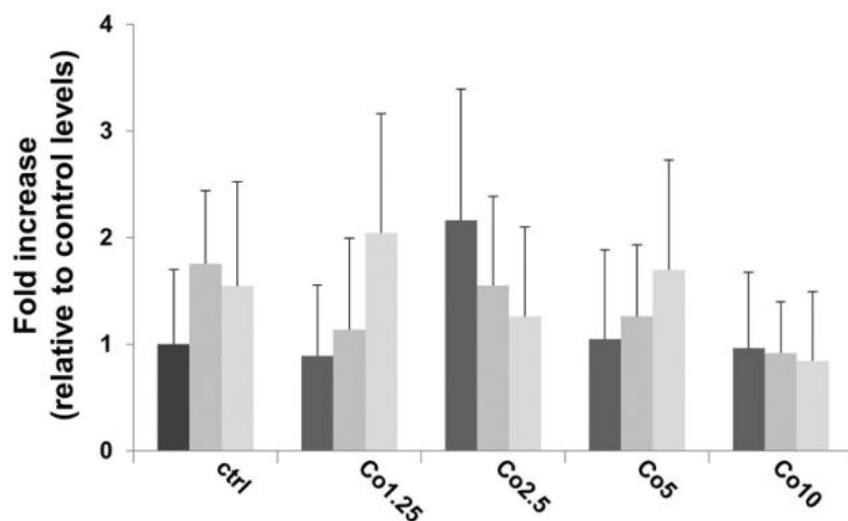


Figura 9.7. Analisi qRT-PCR dei livelli di espressione di Col10A1 di hADSCs all' interno .di capsule di Ca/Co alginate. L'espressione è stata normalizzata a quella di GAPDH e calcolata rispetto all'espressione delle cellule nelle capsule di controllo dopo 7 giorni di coltura. I valori indicano la media  $\pm$  deviazione standard di 3 differenti esperimenti. \* Indica una differenza significativa rispetto al controllo ( $P < 0.05$ ).



## 10. Produzione di sistemi microfluidici “low cost” utilizzabili per la produzione di scaffold microparticellari

La microfluidica è un emergente campo tecnologico che permette di manipolare piccole quantità di fluidi all'interno di micro/nanoambienti, Trova applicazione nella miniaturizzazione di molti processi di laboratorio che vanno dalla sintesi chimica, allo screening farmacologico, migliorandone l'efficienza e diminuendone sensibilmente i costi <sup>260 261 262</sup>.

Recentemente, sono state descritte diverse tecniche microfluidiche con lo scopo di produrre microparticelle in maniera omogenea ed riproducibile. Rispetto ai metodi convenzionali, l'utilizzo di microchip permette di produrre microsistemi in continuo con la possibilità, in tempo reale, di controllarne morfologia, forma e dimensioni <sup>263</sup>. Inoltre, lo sfruttamento di tali sistemi ha aperto la strada a nuove strategie per l'incapsulamento di cellule tramite la produzione dei così detti *hydrogel microdevices* <sup>264</sup>. La sintesi di microparticelle tramite approccio microfluidico avviene tramite la continua rottura di un flusso multifasico di una soluzione polimerica da parte di un altro flusso, costituito da un liquido immiscibile con il primo, nel momento in cui questi vengono a contatto. La destabilizzazione del flusso provoca la formazione di un emulsione e quindi di microgocce che, in seguito a consolidamento, si trasformano in microparticelle <sup>265</sup>.

L'omogeneità dimensionale delle particelle è strettamente correlata al momento in cui si produce l'emulsione, infatti un sistema microfluidico ottimale dovrebbe essere in grado di generare una corrente stabile di gocce in termini di volume e velocità di produzione. Questo dipende dalla geometria dei canali che

costituiscono il chip, dalle velocità di flusso dei liquidi nonché dalle loro proprietà chimico-fisiche (coefficienti di ripartizione, viscosità, tensione interfacciale ecc.)<sup>266</sup>. Riguardo la struttura dei canali, esistono già in commercio chip aventi geometrie ben definite, i quali prendono il nome (solo per citarne alcuni esempi) di *T-junction*, *cross junction* e *microcapillary coaxial devices*<sup>267</sup>. Questa parte del lavoro è stata incentrata sulla progettazione, realizzazione e validazione di chip microfluidici a geometria *cross junction* con lo scopo produrre capsule di dimensione micrometriche ed in maniera riproducibile. Il principio di un microchip a *cross junction* fa affidamento sulla tecnologia *flow focusing* il cui funzionamento si basa sullo “schiacciamento” (*squeezing*) di un flusso centrale di soluzione polimerica, da parte di due flussi laterali di fase esterna perpendicolari al canale centrale (figura 10.1). L'incontro delle due fasi avviene in corrispondenza di un inserzione a croce (da qui il nome *cross junction*) dove sia l' interruzione periodica del flusso della fase interna e la conseguente formazione dell' emulsione <sup>266</sup>. Il motivo per cui l'attenzione è stata focalizzata sulla produzione “*home made*” di chip microfluidici risiede nel fatto che, a dispetto dei vantaggi, il costo di questi sistemi rimane alquanto elevato. Ad esempio, un chip standard a geometria *cross-junction* ha un valore commerciale compreso tra 110 e 130 € che può aumentare drammaticamente nel caso si volesse un *custom device* progettato per applicazioni particolari. Tale costo è giustificato dal fatto che le procedure per ottenere strutture micrometriche richiedono, talvolta, strumentazioni sofisticate e dedicate le quali vengono prodotte e vendute da un ristretto numero di ditte specializzate.

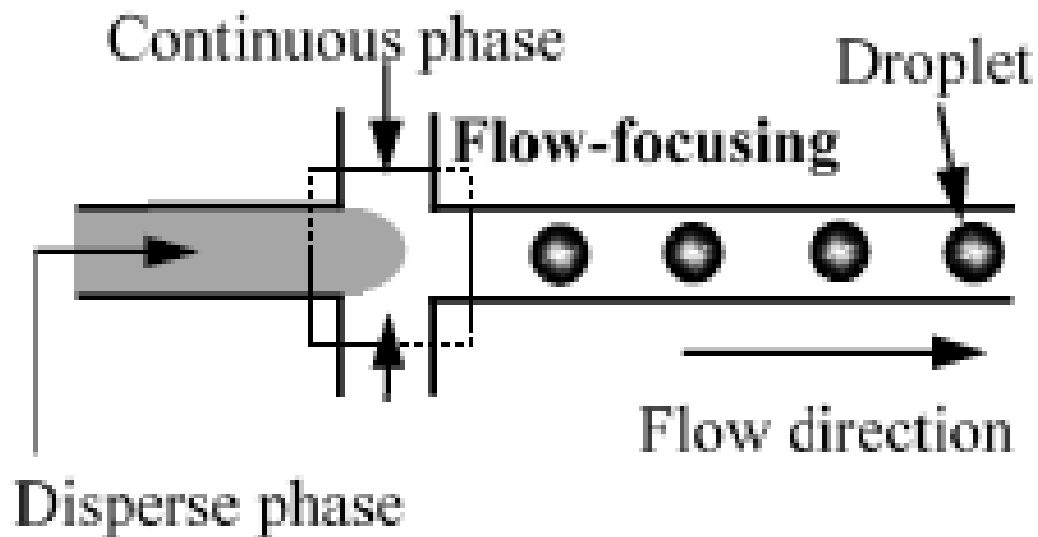


Figura 10.1. Schema generale di un chip microfluidico a geometria *cross-junction* che sfrutta la tecnologia *flow focusing*<sup>268</sup>.

La procedura messa a punto nel presente lavoro ha permesso di ottenere dei chip con canali delle dimensioni di circa 500  $\mu\text{m}$  utilizzando materiali e strumenti facilmente reperibili e relativamente poco costosi. Questo è stato possibile utilizzando gel di agarosio sfruttando la capacità di quest'ultimo di ridurre le proprie dimensioni se sottoposto ad una disidratazione controllata.

In figura 10.2 sono mostrati gli step principali coinvolti nella produzione dei chip, ovvero: 1. Microlavorazione del template; 2. Formazione del master (tramite consolidazione dell'idrogel); 3. Restringimento (*shrinking*) del master; 4. Formazione delle repliche a base di resine; 5. Assemblaggio delle porte; 6. Chiusura dei microcanali. Prima della realizzazione fisica del chip, la sua geometria ed il percorso dei canali sono stati disegnati tramite un programma freeware (Blender Software) dopodiché sono stati ottenuti realizzati i template tramite microlavorazione delle basi polimeriche per mezzo di un trapano a colonna

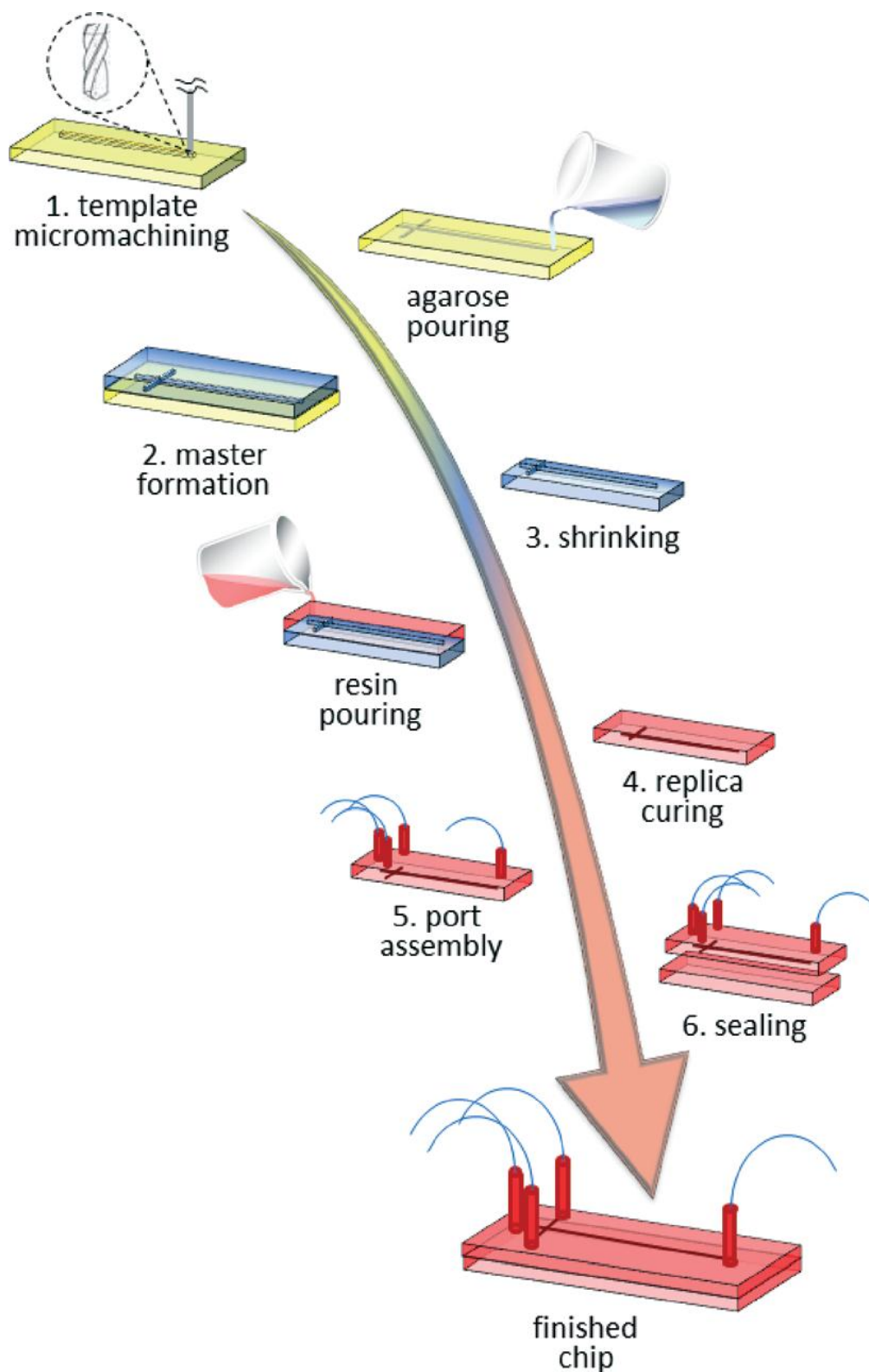


Figura 10.2. Schema generale che riassume le fasi principali coinvolte nella produzione di chip microfluidici *low cost*.

(tecnica *micromilling*) acquistabile in negozi per il “fai da te” al costo di circa 300 euro. Il *micromilling* è una tecnica di lavorazione basata sulla rimozione meccanica di materiale, è considerato un approccio conveniente e versatile se comparato ad altri metodi di microlavorazione come la fotolitografia <sup>269</sup>. Per la realizzazione dei template sono stati testati diversi materiali. Inizialmente l'attenzione è stata posta sull'uso di resine epossidiche, materiali molto utilizzati per l'inclusione di campioni in microscopia elettronica <sup>270</sup>. Per migliorare le caratteristiche di lavorabilità, le resine sono state ottenute miscelando quantità variabili di medium, indurente ed acceleratore e aggiungendo dei plasticizzanti (PEG e trietilcitrate). Dopo diverse prove si è notato che la miscela che permetteva la realizzazione di basi ben lavorabili e resistenti alle fratture era composta da Epon\_812 Medium, DDSA, DPM-30 e trietilcitrate in rapporto 5 : 3 : 1 : 1 (p/p/p/p). Le stesse caratteristiche sono mostrate anche da delle piastre polimeriche come resina EMAX, Delrin e PMMA (figura 10.3).

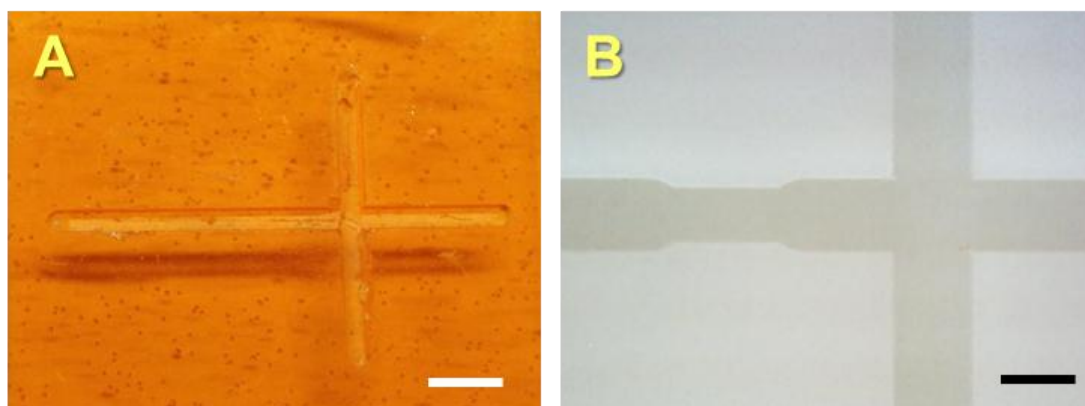


Figura 10.3. Template prodotti tramite microlavorazione in A: resina epossidica, B: derlin. Barra A: 4 mm; B:1 mm.

I master sono dei calchi “in positivo” dei template, ottenuti in modo tale da avere dei rilievi che serviranno da matrice per la formazione di canali microfluidici. La loro produzione è avvenuta facendo colare un gel liquido di agarosio al di sopra della superficie lavorata dei template e, poi, lasciato a consolidare per circa 3 ore. A questo punto, il gel è stato rimosso delicatamente dal template ed immerso in solventi disidratanti (sfruttando lo stesso concetto su cui si basa la preparazione dei campioni biologici in microscopia <sup>271</sup>) in modo da ottenere un controllato e progressivo restringimento dei master e quindi dei rilievi dei canali. Inizialmente sono stati utilizzati alcol etilico ed una miscela di alcol/glicerolo 50:50 (v/v), in questa situazione la diminuzione delle dimensioni del gel era ben visibile macroscopicamente ma un'analisi microscopica più approfondita ha mostrato una deformazione dei canali in rilievo. Buoni risultati, invece, sono stati ottenuti utilizzando solventi poliossietilenici, PEG200 e PEG600, quali non influiscono sulla geometria e la struttura del gel; in particolare, il PEG600 ha permesso un restringimento più accentuato delle dimensioni dei canali con una riduzione di circa il 60% rispetto ai valori originali (da 800  $\mu\text{m}$  a 505  $\mu\text{m}$ ) dopo 96 ore dal trattamento (Figura 10.4).

Una volta raggiunte le dimensioni desiderate, il master è stato usato come stampo per ottenere *replica* avvalendosi della tecnica *soft lithography*<sup>272</sup> la quale permette la duplicazione delle informazioni (forma e morfologia) di una determinata struttura (nel nostro caso i master) tramite l'utilizzo pre-polimeri consolidati *in situ*. I *replica* sono stati prodotti tramite PDMS, un materiale silconico che gode di ottima popolarità in campo microfluidico in quanto permette di replicare strutture (sub)micrometriche, ha un'alta resistenza chimica e meccanica ed un costo contenuto<sup>260</sup>. Una volta consolidati, ai canali

contenuti nei *replica* sono stati aggiunti dei sistemi di interconnessione (*porting*) e sono stati sigillati tramite tecniche e strumentazioni a basso costo descritte in letteratura<sup>226, 228</sup>.

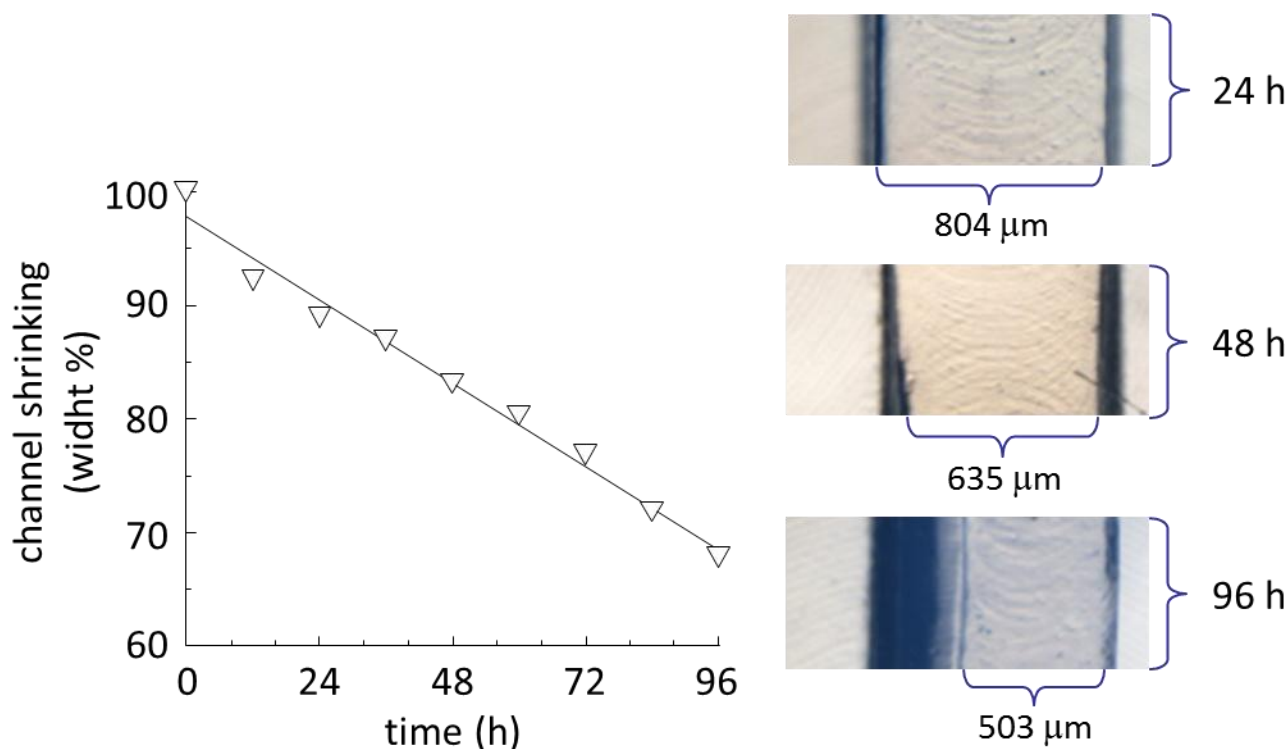


Figura 10.4. Effetto del solvente disidratante PEG 600 sulla riduzione della dimensione dei canali di un master di gel di agarosio al 4% (p/v). Le immagini al microscopio ottico mostrano la morfologia dei rilievi del master dopo 24 , 48 e 96 h dal trattamento.

Un esempio di chip ottenuto con questa tecnica è mostrato in figura 10.5. Per dimostrarne la funzionalità, tale device è stato utilizzato per produrre sistemi microparticellari a base di cellulosa acetato (CA). L'emulsione iniziale è stata ottenuta pompando a livello del canale centrale una soluzione di CA in acetone-etilacetato (oil phase, OP) e nei due canali laterali una soluzione acquosa di Carbopol (water phase, WP), un polimero utilizzato per migliorare la stabilità dell'emulsione. In linea con quanto descritto, l'emulsione si ottiene una volta che le soluzioni si incontrano nel punto di giunzione dei tre canali; la

tensione superficiale fra i liquidi destabilizza il flusso stazionario della OP generando un flusso multifasico e, di conseguenza, gocce monodisperse<sup>273</sup>

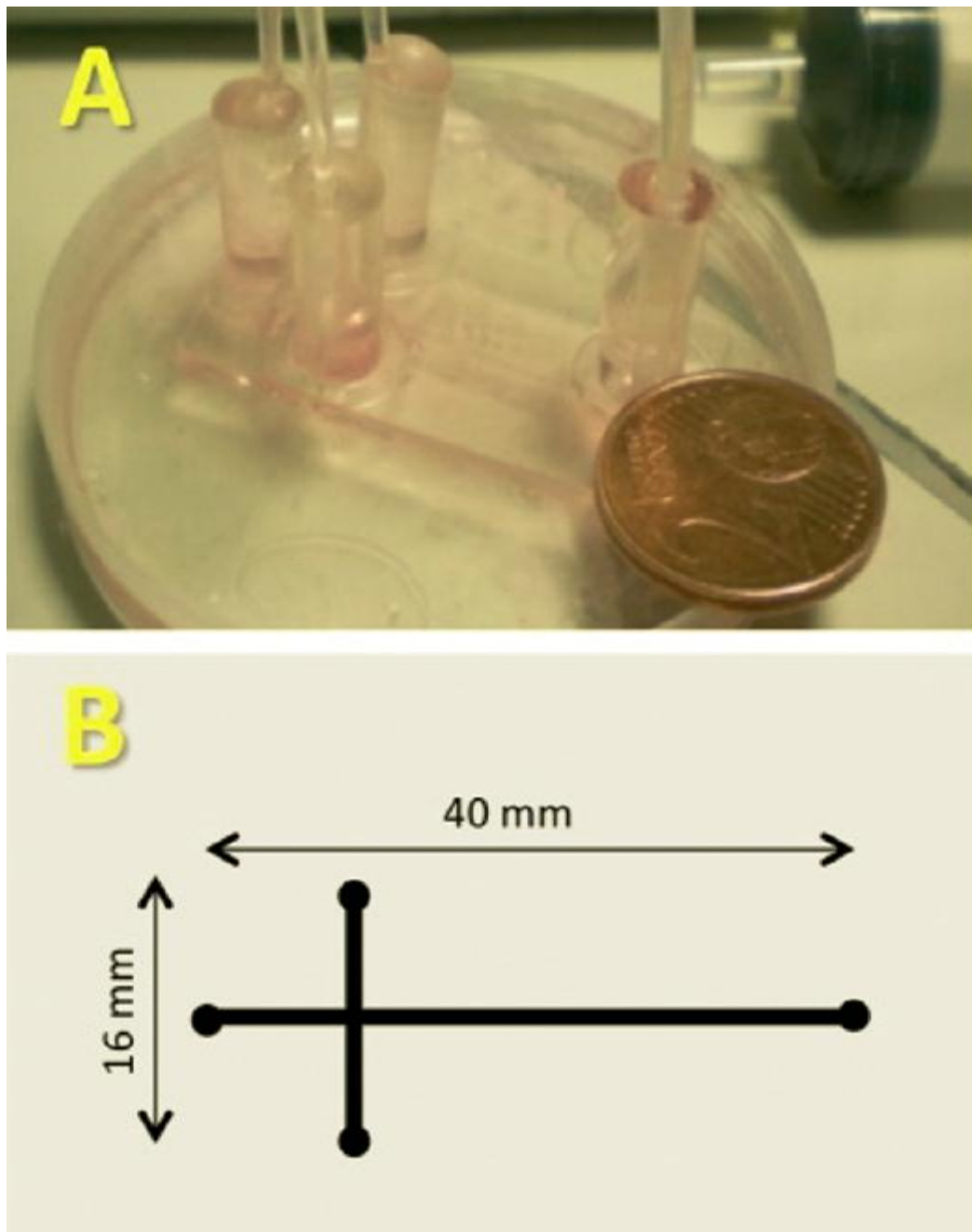


Figura 10.5. A: Fotografia di un chip microfluidico *low cost* assemblato e B: rappresentazione schematica di un pattern *flow focusing*.

In figura x è mostrata un'immagine delle particelle prodotte e la loro relativa distribuzione dimensionale utilizzando una velocità di flusso di 0.1 e 4.0 ml min<sup>-1</sup> per l'OP e WP, rispettivamente. Da notare che è stato altresì possibile



variare le dimensioni medie delle microparticelle cambiando le velocità di flusso di entrambe le fasi.

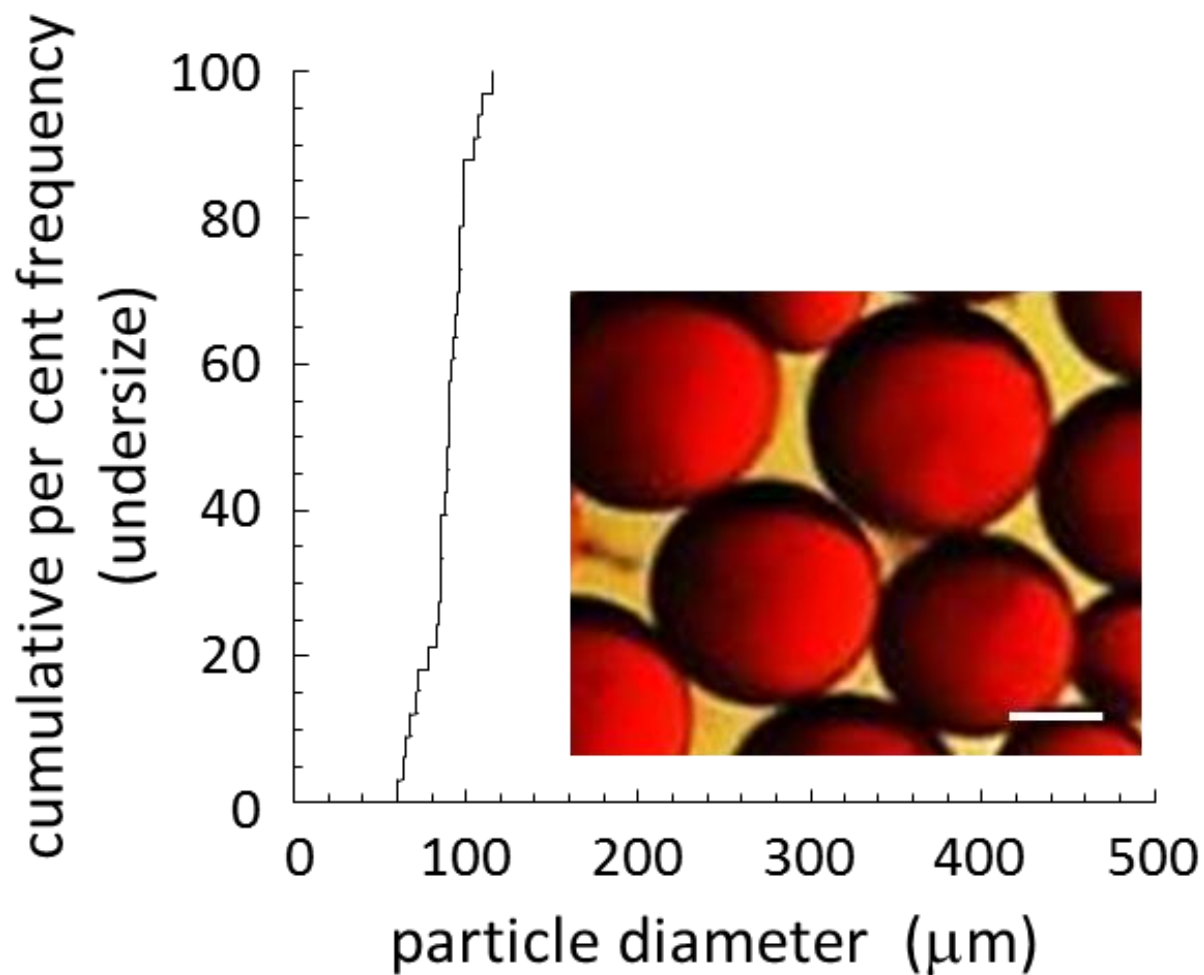


Figura 10.6. Distribuzione dimensionale cumulativa di microparticelle di cellulosa acetato ottenute utilizzando chip microfluidico *low cost*. Barra: 70 μm.

## Conclusione

Lo scopo del TE è quello di riuscire a riprodurre tessuti ed organi in laboratorio per poter essere utilizzati come sostituti di porzioni malfunzionanti o totalmente mancanti dell'organismo. Molti passi in avanti sono stati fatti per la ricostruzione della cartilagine articolare ma un ottimale ripristino del tessuto è ancora lontano.

In questo lavoro di tesi è stata posta l'attenzione sulla capacità delle ADSC di formare tessuto cartilagineo. Tali cellule hanno il vantaggio di essere facilmente reperibili in grandi quantità e con interventi minimamente invasivi rispetto a cellule staminali mesenchimali presenti in altri distretti.

Inizialmente, le ADSC sono state seminate in uno scaffold di gelatina/genipina ed è stata valutata la capacità di tale materiale nell'indurre un differenziamento cartilagineo. Pur ottenendo buoni risultati in comparazione ad una coltura in monostrato, la capacità di produrre matrice da parte delle cellule era fortemente legata alla presenza di fattori differenziativi.

Con lo scopo sia di migliorare l'induzione del differenziamento sia di abbattere gli alti costi dovuti all'uso di molecole differenziative, è stato messo a punto un metodo per la realizzazione di un biomateriale a base di alginato e cobalto in modo da mantenere le cellule all'interno di un ambiente che ricalchi fortemente il comparto fisico della cartilagine *in vivo* piuttosto che il suo intorno chimico.

Infine, l'ultima parte del lavoro è stata incentrata sullo sviluppo di tecnologie innovative per la produzione scaffold biomimetici a patto che questi potessero essere ottenute e sfruttati in maniera economicamente sostenibile. La progettazione e la produzione di chip microfluidici a basso costo ha permesso di gettare le basi per la realizzazione di sistemi micrometrici utili per ottenere

un'incapsulazione cellulare e, di conseguenza, un tessuto cartilagineo ingegnerizzato.

## Referenze

1. F. J. O'Brien, *Materials Today*, 2011, 14, 88-95.
2. R. Gurunluoglu, A. Gurunluoglu and J. Arton, *J Med Biogr*, 2015, DOI: 10.1177/0967772015578575.
3. M. S. Chapekar, *J Biomed Mater Res*, 2000, 53, 617-620.
4. K. J. Walgenbach, M. Voigt, A. W. Riabikhin, C. Andree, D. J. Schaefer, T. J. Galla and G. Bjorn, *Anat Rec*, 2001, 263, 372-378.
5. A. Persidis, *Nat Biotechnol*, 1999, 17, 508-510.
6. D. A. Banyard, J. M. Bourgeois, A. D. Widgerow and G. R. Evans, *Plast Reconstr Surg*, 2015, 135, 1740-1748.
7. R. Langer and J. Vacanti, *J Pediatr Surg*, 2016, 51, 8-12.
8. G. Chen, Y. Qi, L. Niu, T. Di, J. Zhong, T. Fang and W. Yan, *Biomed Rep*, 2015, 3, 749-757.
9. E. S. Place, J. H. George, C. K. Williams and M. M. Stevens, *Chem Soc Rev*, 2009, 38, 1139-1151.
10. A. Atala, *Rejuvenation Res*, 2004, 7, 15-31.
11. N. I. o. Health, Tissue Engineering and Regenerative Medicine, <http://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>.
12. R. Katari, A. Peloso and G. Orlando, *Front Bioeng Biotechnol*, 2014, 2, 57.
13. G. Orlando, P. Di Cocco, M. D'Angelo, K. Clemente, A. Famulari and F. Pisani, *Transplant Proc*, 2010, 42, 1011-1013.
14. R. D. Abbott and D. L. Kaplan, *Trends Biotechnol*, 2015, 33, 401-407.
15. X. Y. Zhang, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19, 220-224.
16. A. Berner, J. C. Reichert, M. A. Woodruff, S. Saifzadeh, A. J. Morris, D. R. Epari, M. Nerlich, M. A. Schuetz and D. W. Hutmacher, *Acta Biomater*, 2013, 9, 7874-7884.
17. S. X. Yan, X. M. Deng and W. Wei, *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34, 453-454.
18. N. M. Mount, S. J. Ward, P. Kefalas and J. Hyllner, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2015, 370, 20150017.
19. J. Ringe, C. Kaps, G. R. Burmester and M. Sittlinger, *Naturwissenschaften*, 2002, 89, 338-351.
20. J. L. Olson, A. Atala and J. J. Yoo, *Chonnam Med J*, 2011, 47, 1-13.
21. J. M. Kelm and M. Fussenegger, *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62, 753-764.
22. E. Kon, A. Roffi, G. Filardo, G. Tesei and M. Marcacci, *Arthroscopy*, 2015, 31, 767-775.
23. D. Aibibu, M. Hild, M. Woltje and C. Cherif, *J Mater Sci Mater Med*, 2016, 27, 63.
24. F. Jakob, R. Ebert, M. Rudert, U. Noth, H. Walles, D. Docheva, M. Schieker, L. Meinel and J. Groll, *Cell Tissue Res*, 2012, 347, 725-735.
25. A. Atala, *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20, 575-592.
26. J. F. Stoltz, N. de Isla, Y. P. Li, D. Bensoussan, L. Zhang, C. Huselstein, Y. Chen, V. Decot, J. Magdalou, N. Li, L. Reppel and Y. He, *Stem Cells Int*, 2015, 2015, 734731.
27. P. Bianco and P. G. Robey, *Nature*, 2001, 414, 118-121.
28. T. Petersen and L. Niklason, *Biomaterials*, 2007, 28, 3751-3756.
29. J. M. Polak and A. E. Bishop, *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1068, 352-366.
30. T. Hodgkinson, X. F. Yuan and A. Bayat, *Expert Rev Med Devices*, 2009, 6, 621-640.
31. S. Mitalipov and D. Wolf, *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2009, 114, 185-199.
32. M. A. Surani, G. Durcova-Hills, P. Hajkova, K. Hayashi and W. W. Tee, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008, 73, 9-15.
33. G. Martello and A. Smith, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30, 647-675.
34. M. Richards, C. Y. Fong, W. K. Chan, P. C. Wong and A. Bongso, *Nat Biotechnol*, 2002, 20, 933-936.
35. J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones, *Science*, 1998, 282, 1145-1147.
36. B. E. Reubinoff, M. F. Pera, C. Y. Fong, A. Trounson and A. Bongso, *Nat Biotechnol*, 2000, 18, 399-404.
37. A. H. Brivanlou, F. H. Gage, R. Jaenisch, T. Jessell, D. Melton and J. Rossant, *Science*, 2003, 300, 913-916.

38. B. E. Reubinoff, P. Itsykson, T. Turetsky, M. F. Pera, E. Reinhartz, A. Itzik and T. Ben-Hur, *Nat Biotechnol*, 2001, 19, 1134-1140.
39. M. Schuldiner, R. Eiges, A. Eden, O. Yanuka, J. Itskovitz-Eldor, R. S. Goldstein and N. Benvenisty, *Brain Res*, 2001, 913, 201-205.
40. M. Schuldiner, O. Yanuka, J. Itskovitz-Eldor, D. A. Melton and N. Benvenisty, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97, 11307-11312.
41. D. S. Kaufman, E. T. Hanson, R. L. Lewis, R. Auerbach and J. A. Thomson, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98, 10716-10721.
42. I. Kehat, D. Kenyagin-Karsenti, M. Snir, H. Segev, M. Amit, A. Gepstein, E. Livne, O. Binah, J. Itskovitz-Eldor and L. Gepstein, *J Clin Invest*, 2001, 108, 407-414.
43. S. Levenberg, J. S. Golub, M. Amit, J. Itskovitz-Eldor and R. Langer, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99, 4391-4396.
44. S. Assady, G. Maor, M. Amit, J. Itskovitz-Eldor, K. L. Skorecki and M. Tzukerman, *Diabetes*, 2001, 50, 1691-1697.
45. J. Itskovitz-Eldor, M. Schuldiner, D. Karsenti, A. Eden, O. Yanuka, M. Amit, H. Soreq and N. Benvenisty, *Mol Med*, 2000, 6, 88-95.
46. M. Girlovanu, S. Susman, O. Soritau, D. Rus-Ciucu, C. Melincovici, A. M. Constantin and C. M. Mihu, *Clujul Med*, 2015, 88, 265-271.
47. C. Mummery, *Eur J Endocrinol*, 2004, 151 Suppl 3, U7-12.
48. I. de Miguel-Beriain, *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 82-83, 176-180.
49. I. Wilmut, A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. Campbell, *Nature*, 1997, 385, 810-813.
50. D. Shi, F. Lu, Y. Wei, K. Cui, S. Yang, J. Wei and Q. Liu, *Biol Reprod*, 2007, 77, 285-291.
51. A. Baguisi, E. Behboodi, D. T. Melican, J. S. Pollock, M. M. Destrempes, C. Cammuso, J. L. Williams, S. D. Nims, C. A. Porter, P. Midura, M. J. Palacios, S. L. Ayres, R. S. Denniston, M. L. Hayes, C. A. Ziomek, H. M. Meade, R. A. Godke, W. G. Gavin, E. W. Overstrom and Y. Echelard, *Nat Biotechnol*, 1999, 17, 456-461.
52. T. Wakayama, A. C. Perry, M. Zuccotti, K. R. Johnson and R. Yanagimachi, *Nature*, 1998, 394, 369-374.
53. I. A. Polejaeva, S. H. Chen, T. D. Vaught, R. L. Page, J. Mullins, S. Ball, Y. Dai, J. Boone, S. Walker, D. L. Ayares, A. Colman and K. H. Campbell, *Nature*, 2000, 407, 86-90.
54. K. Hochedlinger, W. M. Rideout, M. Kyba, G. Q. Daley, R. Blelloch and R. Jaenisch, *Hematol J*, 2004, 5 Suppl 3, S114-117.
55. G. Verma, J. S. Arora, R. S. Sethi, C. S. Mukhopadhyay and R. Verma, *J Anim Sci Biotechnol*, 2015, 6, 43.
56. A. Dinnyes, P. De Sousa, T. King and I. Wilmut, *Cloning Stem Cells*, 2002, 4, 81-90.
57. K. Takahashi and S. Yamanaka, *Cell*, 2006, 126, 663-676.
58. M. Wernig, A. Meissner, R. Foreman, T. Brambrink, M. Ku, K. Hochedlinger, B. E. Bernstein and R. Jaenisch, *Nature*, 2007, 448, 318-324.
59. K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka, *Cell*, 2007, 131, 861-872.
60. J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II and J. A. Thomson, *Science*, 2007, 318, 1917-1920.
61. S. Miyazaki, H. Yamamoto, N. Miyoshi, H. Takahashi, Y. Suzuki, N. Haraguchi, H. Ishii, Y. Doki and M. Mori, *Jpn J Clin Oncol*, 2012, 42, 773-779.
62. E. A. McCulloch and J. E. Till, *Radiat Res*, 1964, 22, 383-397.
63. B. Bussolati, S. Bruno, C. Grange, S. Buttiglieri, M. C. Deregibus, D. Cantino and G. Camussi, *Am J Pathol*, 2005, 166, 545-555.
64. N. D. Leipzig and M. S. Shoichet, *Biomaterials*, 2009, 30, 6867-6878.
65. U. B. Jensen, X. Yan, C. Triel, S. H. Woo, R. Christensen and D. M. Owens, *J Cell Sci*, 2008, 121, 609-617.
66. H. D. Zomer, A. S. Vidane, N. N. Goncalves and C. E. Ambrosio, *Stem Cells Cloning*, 2015, 8, 125-134.
67. R. A. Webster, S. P. Blaber, B. R. Herbert, M. R. Wilkins and G. Vesey, *N Z Vet J*, 2012, 60, 265-272.

68. K. C. Elahi, G. Klein, M. Avci-Adali, K. D. Sievert, S. MacNeil and W. K. Aicher, *Stem Cells Int*, 2016, 2016, 5646384.
69. M. Krampera, S. Marconi, A. Pasini, M. Galie, G. Rigotti, F. Mosna, M. Tinelli, L. Lovato, E. Anghileri, A. Andreini, G. Pizzolo, A. Sbarbati and B. Bonetti, *Bone*, 2007, 40, 382-390.
70. H. Aurich, M. Sgodda, P. Kaltwasser, M. Vetter, A. Weise, T. Liehr, M. Brulport, J. G. Hengstler, M. M. Dollinger, W. E. Fleig and B. Christ, *Gut*, 2009, 58, 570-581.
71. M. Strioga, S. Viswanathan, A. Darinskas, O. Slaby and J. Michalek, *Stem Cells Dev*, 2012, 21, 2724-2752.
72. A. Lange-Consiglio, D. Rossi, S. Tassan, R. Perego, F. Cremonesi and O. Parolini, *Stem Cells Dev*, 2013, 22, 3015-3024.
73. J. A. Plock, J. T. Schnider, M. G. Solari, X. X. Zheng and V. S. Gorantla, *Front Immunol*, 2013, 4, 175.
74. C. L. Insausti, M. Blanquer, A. M. Garcia-Hernandez, G. Castellanos and J. M. Moraleda, *Stem Cells Cloning*, 2014, 7, 53-63.
75. A. I. Caplan, *J Cell Physiol*, 2007, 213, 341-347.
76. D. Dey and G. R. Evans, *Stem Cells Int*, 2011, 2011, 619583.
77. P. C. Sachs, M. P. Francis, M. Zhao, J. Brumelle, R. R. Rao, L. W. Elmore and S. E. Holt, *Cell Tissue Res*, 2012, 349, 505-515.
78. X. F. Yang, X. He, J. He, L. H. Zhang, X. J. Su, Z. Y. Dong, Y. J. Xu, Y. Li and Y. L. Li, *J Biomed Sci*, 2011, 18, 59.
79. F. P. Barry, R. E. Boynton, S. Haynesworth, J. M. Murphy and J. Zaia, *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 265, 134-139.
80. M. J. Martinez-Lorenzo, M. Royo-Canas, E. Alegre-Aguaron, P. Desportes, T. Castiella, F. Garcia-Alvarez and L. Larrad, *J Orthop Res*, 2009, 27, 1499-1507.
81. H. Takemitsu, D. Zhao, I. Yamamoto, Y. Harada, M. Michishita and T. Arai, *BMC Vet Res*, 2012, 8, 150.
82. A. H. Kisiel, L. A. McDuffee, E. Masaoud, T. R. Bailey, B. P. Esparza Gonzalez and R. Nino-Fong, *Am J Vet Res*, 2012, 73, 1305-1317.
83. J. Nichols, B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer and A. Smith, *Cell*, 1998, 95, 379-391.
84. M. Baghaban Eslaminejad and E. Malakooty Poor, *World J Stem Cells*, 2014, 6, 344-354.
85. L. K. Kolaparthi, S. Sanivarapu, S. Moogla and R. S. Kutcham, *Int J Stem Cells*, 2015, 8, 121-127.
86. J. M. Gimble, A. J. Katz and B. A. Bunnell, *Circ Res*, 2007, 100, 1249-1260.
87. G. A. Bray, *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89, 2583-2589.
88. L. E. Kokai, K. Marra and J. P. Rubin, *Transl Res*, 2014, 163, 399-408.
89. Y. Zhu, T. Liu, K. Song, X. Fan, X. Ma and Z. Cui, *Cell Biochem Funct*, 2008, 26, 664-675.
90. P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz and M. H. Hedrick, *Tissue Eng*, 2001, 7, 211-228.
91. I. V. Arutyunyan, A. A. Rzhabinova, A. V. Volkov and D. V. Goldstein, *Bull Exp Biol Med*, 2009, 147, 503-508.
92. L. de Girolamo, M. F. Sartori, W. Albisetti and A. T. Brini, *J Tissue Eng Regen Med*, 2007, 1, 154-157.
93. C. Merceron, C. Vinatier, S. Portron, M. Masson, J. Amiaud, L. Guigand, Y. Cherel, P. Weiss and J. Guicheux, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 298, C355-364.
94. L. Hong, A. Colpan, I. A. Peptan, J. Daw, A. George and C. A. Evans, *Tissue Eng*, 2007, 13, 1197-1203.
95. J. S. Park, H. N. Yang, D. G. Woo, S. Y. Jeon and K. H. Park, *Biomaterials*, 2011, 32, 28-38.
96. L. Chen, X. Lu, S. Li, Q. Sun, W. Li and D. Song, *Orthopedics*, 2012, 35, e1402-1409.
97. D. Pre, G. Ceccarelli, G. Gastaldi, A. Asti, E. Saino, L. Visai, F. Benazzo, M. G. Cusella De Angelis and G. Magenes, *Bone*, 2011, 49, 295-303.
98. M. van Griensven, S. Diederichs, S. Roeker, S. Boehm, A. Peterbauer, S. Wolbank, D. Riechers, F. Stahl and C. Kasper, *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2009, 112, 95-123.
99. H. Hattori, M. Sato, K. Masuoka, M. Ishihara, T. Kikuchi, T. Matsui, B. Takase, T. Ishizuka, M. Kikuchi, K. Fujikawa and M. Ishihara, *Cells Tissues Organs*, 2004, 178, 2-12.
100. W. Hao, Y. Y. Hu, Y. Y. Wei, L. Pang, R. Lv, J. P. Bai, Z. Xiong and M. Jiang, *Cells Tissues Organs*, 2008, 187, 89-102.

101. J. H. Lee, J. W. Rhie, D. Y. Oh and S. T. Ahn, *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 370, 456-460.
102. G. Marino, F. Rosso, G. Cafiero, C. Tortora, M. Moraci, M. Barbarisi and A. Barbarisi, *J Mater Sci Mater Med*, 2010, 21, 353-363.
103. F. H. Shen, Q. Zeng, Q. Lv, L. Choi, G. Balian, X. Li and C. T. Laurencin, *Spine J*, 2006, 6, 615-623.
104. X. Li, H. Liu, X. Niu, B. Yu, Y. Fan, Q. Feng, F. Z. Cui and F. Watari, *Biomaterials*, 2012, 33, 4818-4827.
105. C. Correia, W. Grayson, R. Eton, J. M. Gimble, R. A. Sousa, R. L. Reis and G. Vunjak-Novakovic, *J Tissue Eng Regen Med*, 2014, 8, 629-639.
106. S. Haimi, N. Suuriniemi, A. M. Haaparanta, V. Ella, B. Lindroos, H. Huhtala, S. Raty, H. Kuokkanen, G. K. Sandor, M. Kellomaki, S. Miettinen and R. Suuronen, *Tissue Eng Part A*, 2009, 15, 1473-1480.
107. D. T. Leong, W. K. Nah, A. Gupta, D. W. Huttmacher and M. A. Woodruff, *Curr Drug Discov Technol*, 2008, 5, 319-327.
108. J. I. Huang, S. R. Beanes, M. Zhu, H. P. Lorenz, M. H. Hedrick and P. Benhaim, *Plast Reconstr Surg*, 2002, 109, 1033-1041; discussion 1042-1033.
109. R. Ogawa, H. Mizuno, A. Watanabe, M. Migita, T. Shimada and H. Hyakusoku, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313, 871-877.
110. H. J. Kim and G. I. Im, *J Orthop Res*, 2009, 27, 612-619.
111. C. H. Lu, K. J. Lin, H. Y. Chiu, C. Y. Chen, T. C. Yen, S. M. Hwang, Y. H. Chang and Y. C. Hu, *Tissue Eng Part A*, 2012, 18, 2114-2124.
112. H. A. Awad, M. Q. Wickham, H. A. Leddy, J. M. Gimble and F. Guilak, *Biomaterials*, 2004, 25, 3211-3222.
113. H. Betre, S. R. Ong, F. Guilak, A. Chilkoti, B. Fermor and L. A. Setton, *Biomaterials*, 2006, 27, 91-99.
114. I. S. Yoon, C. W. Chung, J. H. Sung, H. J. Cho, J. S. Kim, W. S. Shim, C. K. Shim, S. J. Chung and D. D. Kim, *J Biosci Bioeng*, 2011, 112, 402-408.
115. M. Ahearne, C. T. Buckley and D. J. Kelly, *Biotechnol Appl Biochem*, 2011, 58, 345-352.
116. C. Eriskien, D. M. Kalyon, H. Wang, C. Ornek-Ballanco and J. Xu, *Tissue Eng Part A*, 2011, 17, 1239-1252.
117. B. Zheng, B. Cao, G. Li and J. Huard, *Tissue Eng*, 2006, 12, 1891-1901.
118. H. Mizuno, P. A. Zuk, M. Zhu, H. P. Lorenz, P. Benhaim and M. H. Hedrick, *Plast Reconstr Surg*, 2002, 109, 199-209; discussion 210-191.
119. P. A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim and M. H. Hedrick, *Mol Biol Cell*, 2002, 13, 4279-4295.
120. L. V. Rodriguez, Z. Alfonso, R. Zhang, J. Leung, B. Wu and L. J. Ignarro, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103, 12167-12172.
121. C. Wang, S. Yin, L. Cen, Q. Liu, W. Liu, Y. Cao and L. Cui, *Tissue Eng Part A*, 2010, 16, 1201-1213.
122. L. J. Harris, H. Abdollahi, P. Zhang, S. McIlhenny, T. N. Tulenko and P. J. DiMuzio, *J Surg Res*, 2011, 168, 306-314.
123. S. Rangappa, C. Fen, E. H. Lee, A. Bongso and E. K. Sim, *Ann Thorac Surg*, 2003, 75, 775-779.
124. A. van Dijk, H. W. Niessen, B. Zandieh Doulabi, F. C. Visser and F. J. van Milligen, *Cell Tissue Res*, 2008, 334, 457-467.
125. W. Chang, S. Lim, B. W. Song, C. Y. Lee, M. S. Park, Y. A. Chung, C. Yoon, S. Y. Lee, O. Ham, J. H. Park, E. Choi, L. S. Maeng and K. C. Hwang, *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424, 740-746.
126. Y. S. Choi, G. J. Dusting, S. Stubbs, S. Arunothayaraj, X. L. Han, P. Collas, W. A. Morrison and R. J. Dilley, *J Cell Mol Med*, 2010, 14, 878-889.
127. J. Lue, G. Lin, H. Ning, A. Xiong, C. S. Lin and J. S. Glenn, *Liver Int*, 2010, 30, 913-922.
128. B. S. Kim and D. J. Mooney, *Trends Biotechnol*, 1998, 16, 224-230.
129. A. G. Mikos, L. V. McIntire, J. M. Anderson and J. E. Babensee, *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 33, 111-139.
130. D. W. Huttmacher, *Biomaterials*, 2000, 21, 2529-2543.
131. F. H. Silver and G. Pins, *J Long Term Eff Med Implants*, 1992, 2, 67-80.
132. F. J. O'Brien, B. A. Harley, I. V. Yannas and L. J. Gibson, *Biomaterials*, 2005, 26, 433-441.
133. C. M. Murphy, M. G. Haugh and F. J. O'Brien, *Biomaterials*, 2010, 31, 461-466.
134. S. J. Hollister, *Biofabrication*, 2009, 1, 012001.
135. J. L. Pariente, B. S. Kim and A. Atala, *J Biomed Mater Res*, 2001, 55, 33-39.

136. J. L. Pariente, B. S. Kim and A. Atala, *J Urol*, 2002, 167, 1867-1871.
137. L. Cen, W. Liu, L. Cui, W. Zhang and Y. Cao, *Pediatr Res*, 2008, 63, 492-496.
138. T. J. Keane and S. F. Badylak, *Semin Pediatr Surg*, 2014, 23, 112-118.
139. A. Asti and L. Gioglio, *Int J Artif Organs*, 2014, 37, 187-205.
140. E. Dawson, G. Mapili, K. Erickson, S. Taqvi and K. Roy, *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60, 215-228.
141. R. H. Fu, Y. C. Wang, S. P. Liu, C. M. Huang, Y. H. Kang, C. H. Tsai, W. C. Shyu and S. Z. Lin, *Cell Transplant*, 2011, 20, 37-47.
142. D. M. Bissell, D. M. Arenson, J. J. Maher and F. J. Roll, *J Clin Invest*, 1987, 79, 801-812.
143. C. S. Hughes, L. M. Postovit and G. A. Lajoie, *Proteomics*, 2010, 10, 1886-1890.
144. G. Benton, I. Arnaoutova, J. George, H. K. Kleinman and J. Koblinski, *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 79-80, 3-18.
145. D. J. Kim, B. R. Yi, H. R. Lee, S. U. Kim and K. C. Choi, *Oncol Rep*, 2013, 30, 1129-1136.
146. V. Planat-Benard, J. S. Silvestre, B. Cousin, M. Andre, M. Nibbelink, R. Tamarat, M. Clergue, C. Manneville, C. Saillan-Barreau, M. Duriez, A. Tedgui, B. Levy, L. Penicaud and L. Casteilla, *Circulation*, 2004, 109, 656-663.
147. T. C. Laurent and J. R. Fraser, *FASEB J*, 1992, 6, 2397-2404.
148. S. Stein, E. Strauss and J. Bosco, 3rd, *Cartilage*, 2013, 4, 12-19.
149. P. Brun, G. Abatangelo, M. Radice, V. Zacchi, D. Guidolin, D. Daga Gordini and R. Cortivo, *J Biomed Mater Res*, 1999, 46, 337-346.
150. S. Cristino, F. Grassi, S. Toneguzzi, A. Piacentini, B. Grigolo, S. Santi, M. Riccio, E. Tognana, A. Facchini and G. Lisignoli, *J Biomed Mater Res A*, 2005, 73, 275-283.
151. G. Lisignoli, C. Manferdini, E. Lambertini, N. Zini, M. Angelozzi, E. Gabusi, L. Gambari, L. Penolazzi, A. Lolli, A. Facchini and R. Piva, *Tissue Eng Part A*, 2014, 20, 2795-2805.
152. J. Aigner, J. Tegeler, P. Hutzler, D. Campoccia, A. Pavesio, C. Hammer, E. Kastenbauer and A. Naumann, *J Biomed Mater Res*, 1998, 42, 172-181.
153. C. Muscari, F. Bonafe, S. Martin-Suarez, S. Valgimigli, S. Valente, E. Fiumana, F. Fiorelli, G. Rubini, C. Guarnieri, C. M. Caldarera, O. Capitani, G. Arpesella and G. Pasquinelli, *J Cell Mol Med*, 2013, 17, 518-530.
154. S. Hofmann, H. Hagenmuller, A. M. Koch, R. Muller, G. Vunjak-Novakovic, D. L. Kaplan, H. P. Merkle and L. Meinel, *Biomaterials*, 2007, 28, 1152-1162.
155. Y. Wang, U. J. Kim, D. J. Blasioli, H. J. Kim and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, 2005, 26, 7082-7094.
156. Y. Wang, H. J. Kim, G. Vunjak-Novakovic and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, 2006, 27, 6064-6082.
157. M. Lovett, C. Cannizzaro, L. Daheron, B. Messmer, G. Vunjak-Novakovic and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, 2007, 28, 5271-5279.
158. M. D. Tang-Schomer, J. D. White, L. W. Tien, L. I. Schmitt, T. M. Valentin, D. J. Graziano, A. M. Hopkins, F. G. Omenetto, P. G. Haydon and D. L. Kaplan, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111, 13811-13816.
159. V. Patrulea, V. Ostafe, G. Borchard and O. Jordan, *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 97, 417-426.
160. C. Shi, Y. Zhu, X. Ran, M. Wang, Y. Su and T. Cheng, *J Surg Res*, 2006, 133, 185-192.
161. E. E. Antoine, P. P. Vlachos and M. N. Rylander, *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, 20, 683-696.
162. F. A. Auger, M. Rouabhia, F. Goulet, F. Berthod, V. Moulin and L. Germain, *Med Biol Eng Comput*, 1998, 36, 801-812.
163. J. Glowacki and S. Mizuno, *Biopolymers*, 2008, 89, 338-344.
164. C. F. Chang, M. W. Lee, P. Y. Kuo, Y. J. Wang, Y. H. Tu and S. C. Hung, *J Biomed Mater Res A*, 2007, 80, 466-474.
165. *International Journal of Polymer Science*, 2011, 2011.
166. H. S. Lee, S. H. Park, J. H. Lee, B. Y. Jeong, S. K. Ahn, Y. M. Choi, D. J. Choi and J. H. Chang, *Materials Letters*, 2013, 95, 40-43.
167. P. Gentile, V. Chiono, I. Carmagnola and P. V. Hatton, *Int J Mol Sci*, 2014, 15, 3640-3659.
168. R. P. Felix Lanao, A. M. Jonker, J. G. Wolke, J. A. Jansen, J. C. van Hest and S. C. Leeuwenburgh, *Tissue Eng Part B Rev*, 2013, 19, 380-390.
169. J. Kasuya and K. Tanishita, *Biomatter*, 2012, 2, 290-295.



170. E. S. Fioretta, J. O. Fledderus, E. A. Burakowska-Meise, F. P. Baaijens, M. C. Verhaar and C. V. Bouten, *Macromol Biosci*, 2012, 12, 577-590.
171. P. Chandra and S. J. Lee, *Biomark Insights*, 2015, 10, 105-116.
172. C. G. Jeong, H. Zhang and S. J. Hollister, *J Biomed Mater Res A*, 2012, 100, 2088-2096.
173. C. L. Salgado, E. M. Sanchez, C. A. Zavaglia, A. B. Almeida and P. L. Granja, *Tissue Eng Part A*, 2012, 18, 137-146.
174. E. J. Lee, F. K. Kasper and A. G. Mikos, *Ann Biomed Eng*, 2014, 42, 323-337.
175. X. Kang, Y. Xie, H. M. Powell, L. James Lee, M. A. Belury, J. J. Lannutti and D. A. Kniss, *Biomaterials*, 2007, 28, 450-458.
176. B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa and D. S. Kumar, *International Journal of Polymer Science*, 2011, 2011.
177. M. G. Cascone, N. Barbani, C. Cristallini, P. Giusti, G. Ciardelli and L. Lazzeri, *J Biomater Sci Polym Ed*, 2001, 12, 267-281.
178. J. A. Roether, A. R. Boccaccini, L. L. Hench, V. Maquet, S. Gautier and R. Jerjme, *Biomaterials*, 2002, 23, 3871-3878.
179. S. Font Tellado, E. R. Balmayor and M. Van Griensven, *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 94, 126-140.
180. R. S. Tuan, G. Boland and R. Tuli, *Arthritis Res Ther*, 2003, 5, 32-45.
181. K. Lee, E. A. Silva and D. J. Mooney, *J R Soc Interface*, 2011, 8, 153-170.
182. A. C. Mitchell, P. S. Briquez, J. A. Hubbell and J. R. Cochran, *Acta Biomater*, 2016, 30, 1-12.
183. A. T. Mehlhorn, P. Niemeyer, K. Kaschte, L. Muller, G. Finkenzeller, D. Hartl, N. P. Sudkamp and H. Schmal, *Cell Prolif*, 2007, 40, 809-823.
184. A. L. Baltch, R. P. Smith, M. A. Franke, W. J. Ritz, P. Michelsen, L. H. Bopp and J. K. Singh, *Am J Infect Control*, 2000, 28, 251-257.
185. M. Sheykhasan, R. T. Qomi and M. Ghiasi, *Int J Stem Cells*, 2015, 8, 219-227.
186. F. B. S.A. Korossis, J.N. Kearney, J. Fisher and E. Ingham, in *Topics in Tissue Engineering*, ed. N. A. R. L. R. 2005, 2005, vol. 2, ch. 8.
187. D. E. Ingber, L. Dike, L. Hansen, S. Karp, H. Liley, A. Maniotis, H. McNamee, D. Mooney, G. Plopper, J. Sims and et al., *Int Rev Cytol*, 1994, 150, 173-224.
188. A. Ignatius, H. Blessing, A. Liedert, C. Schmidt, C. Neidlinger-Wilke, D. Kaspar, B. Friemert and L. Claes, *Biomaterials*, 2005, 26, 311-318.
189. J. R. Mauney, S. Sjostorm, J. Blumberg, R. Horan, J. P. O'Leary, G. Vunjak-Novakovic, V. Volloch and D. L. Kaplan, *Calcif Tissue Int*, 2004, 74, 458-468.
190. B. O. Oluwole, W. Du, I. Mills and B. E. Sumpio, *Endothelium*, 1997, 5, 85-93.
191. D. Ingber, *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 961, 162-163.
192. F. Grinnell, *J Cell Biol*, 1994, 124, 401-404.
193. C. T. Hung, M. A. LeRoux, G. D. Palmer, P. H. Chao, S. Lo and W. B. Valhmu, *Biorheology*, 2003, 40, 61-72.
194. M. D. Buschmann, Y. A. Gluzband, A. J. Grodzinsky and E. B. Hunziker, *J Cell Sci*, 1995, 108 ( Pt 4), 1497-1508.
195. Z. Zhang, *Tissue Eng Part B Rev*, 2015, 21, 267-277.
196. M. Dvir-Ginzberg and E. Reich, *Biomarkers*, 2014, DOI: 10.3109/1354750x.2014.955884, 1-7.
197. P. J. Roughley, *Eur Cell Mater*, 2006, 12, 92-101.
198. A. P. Hollander, S. C. Dickinson and W. Kafienah, *Stem Cells*, 2010, 28, 1992-1996.
199. B. J. Cole, C. Pascual-Garrido and R. C. Grumet, *Instr Course Lect*, 2010, 59, 181-204.
200. S. R. Frenkel and P. E. Di Cesare, *Front Biosci*, 1999, 4, D671-685.
201. E. Kon, B. Mandelbaum, R. Buda, G. Filardo, M. Delcogliano, A. Timoncini, P. M. Fornasari, S. Giannini and M. Marcacci, *Arthroscopy*, 2011, 27, 1490-1501.
202. E. C. Rodriguez-Merchan, *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 2012, 41, 236-239.
203. R. Mardones, C. M. Jofre and J. J. Minguell, *Int J Stem Cells*, 2015, 8, 48-53.
204. M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson and L. Peterson, *N Engl J Med*, 1994, 331, 889-895.
205. B. Mollon, R. Kandel, J. Chahal and J. Theodoropoulos, *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21, 1824-1833.

206. J. Vanlauwe, D. B. Saris, J. Victor, K. F. Almqvist, J. Bellemans and F. P. Luyten, *Am J Sports Med*, 2011, 39, 2566-2574.
207. L. Peterson, H. S. Vasiliadis, M. Brittberg and A. Lindahl, *Am J Sports Med*, 2010, 38, 1117-1124.
208. J. D. Harris, R. A. Siston, R. H. Brophy, C. Lattermann, J. L. Carey and D. C. Flanigan, *Osteoarthritis Cartilage*, 2011, 19, 779-791.
209. N. Ahmed, L. Gan, A. Nagy, J. Zheng, C. Wang and R. A. Kandel, *Tissue Eng Part A*, 2009, 15, 665-673.
210. N. Ahmed, D. W. Taylor, J. Wunder, A. Nagy, A. E. Gross and R. A. Kandel, *J Tissue Eng Regen Med*, 2010, 4, 233-241.
211. Y. Lu, S. Dhanaraj, Z. Wang, D. M. Bradley, S. M. Bowman, B. J. Cole and F. Binette, *J Orthop Res*, 2006, 24, 1261-1270.
212. S. Wakitani, T. Okabe, S. Horibe, T. Mitsuoka, M. Saito, T. Koyama, M. Nawata, K. Tensho, H. Kato, K. Uematsu, R. Kuroda, M. Kurosaka, S. Yoshiya, K. Hattori and H. Ohgushi, *J Tissue Eng Regen Med*, 2011, 5, 146-150.
213. H. Nejadnik, J. H. Hui, E. P. Feng Choong, B. C. Tai and E. H. Lee, *Am J Sports Med*, 2010, 38, 1110-1116.
214. J. Gille, P. Behrens, P. Volpi, L. de Girolamo, E. Reiss, W. Zoch and S. Anders, *Arch Orthop Trauma Surg*, 2013, 133, 87-93.
215. D. C. Crawford, C. M. Heveran, W. D. Cannon, Jr., L. F. Foo and H. G. Potter, *Am J Sports Med*, 2009, 37, 1334-1343.
216. O. Haddo, S. Mahroof, D. Higgs, L. David, J. Pringle, M. Bayliss, S. R. Cannon and T. W. Briggs, *Knee*, 2004, 11, 51-55.
217. K. L. Spiller, S. A. Maher and A. M. Lowman, *Tissue Eng Part B Rev*, 2011, 17, 281-299.
218. A. G. McNickle, M. T. Provencher and B. J. Cole, *Sports Med Arthrosc*, 2008, 16, 196-201.
219. L. A. Fortier, J. U. Barker, E. J. Strauss, T. M. McCarrel and B. J. Cole, *Clin Orthop Relat Res*, 2011, 469, 2706-2715.
220. M. Jakob, O. Demarteau, D. Schafer, B. Hintermann, W. Dick, M. Heberer and I. Martin, *J Cell Biochem*, 2001, 81, 368-377.
221. G. Musumeci, P. Castrogiovanni, R. Leonardi, F. M. Trovato, M. A. Szychlińska, A. Di Giunta, C. Loreto and S. Castorina, *World J Orthop*, 2014, 5, 80-88.
222. M. Cucchiari, C. Henrionnet, D. Mainard, A. Pinzano and H. Madry, *J Exp Orthop*, 2015, 2, 8.
223. D. Studer, C. Millan, E. Ozturk, K. Maniura-Weber and M. Zenobi-Wong, *Eur Cell Mater*, 2012, 24, 118-135; discussion 135.
224. S. Panzavolta, P. Torricelli, S. Amadori, A. Parrilli, K. Rubini, E. della Bella, M. Fini and A. Bigi, *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101, 3560-3570.
225. J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. Wu, O. J. Schueller and G. M. Whitesides, *Electrophoresis*, 2000, 21, 27-40.
226. S. F. Stefania Mazzitelli, Claudio Nastruzzi, in *Chips and Tips*, 2009.
227. S. C. Debapriya Chakraborty, in *Chips and Tips*, 2009.
228. S. M. Lorenzo Capretto, Stefano Focaroli and Claudio Nastruzzi, Wall plug inspired connectors for macro to microfluidic interfacing, <http://blogs.rsc.org/chipsandtips/page/6/>.
229. U. Farooq, R. Malviya and P. K. Sharma, *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2014, 8, 111-125.
230. Q. Xu, M. Hashimoto, T. T. Dang, T. Hoare, D. S. Kohane, G. M. Whitesides, R. Langer and D. G. Anderson, *Small*, 2009, 5, 1575-1581.
231. N. Sahoo, R. K. Sahoo, N. Biswas, A. Guha and K. Kuotsu, *Int J Biol Macromol*, 2015, 81, 317-331.
232. Q. Zhang, H. Lu, N. Kawazoe and G. Chen, *Acta Biomater*, 2014, 10, 2005-2013.
233. S. Schwarz, L. Koerber, A. F. Elsaesser, E. Goldberg-Bockhorn, A. M. Seitz, L. Durselen, A. Ignatius, P. Walther, R. Breiter and N. Rotter, *Tissue Eng Part A*, 2012, 18, 2195-2209.
234. M. Wang, L. Da, Y. Xie and H. Xie, *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2013, 27, 580-585.
235. E. L. Fong, B. M. Watson, F. K. Kasper and A. G. Mikos, *Adv Mater*, 2012, 24, 4995-5013.
236. A. McAlinden, G. Traeger, U. Hansen, M. A. Weis, S. Ravindran, L. Wirthlin, D. R. Eyre and R. J. Fernandes, *Matrix Biol*, 2014, 34, 105-113.

237. S. R. Herlofsen, A. M. Kuchler, J. E. Melvik and J. E. Brinchmann, *Tissue Eng Part A*, 2011, 17, 1003-1013.
238. E. Duval, C. Bauge, R. Andriamanalijaona, H. Benateau, S. Leclercq, S. Dutoit, L. Poulain, P. Galera and K. Boumediene, *Biomaterials*, 2012, 33, 6042-6051.
239. T. D. Bornes, N. M. Jomha, A. Mulet-Sierra and A. B. Adesida, *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6, 84.
240. G. Clunie, M. Hall-Craggs, M. Paley, A. King, I. Wilkinson, P. Ell and J. Edwards, *Ann Rheum Dis*, 1997, 56, 526-534.
241. T. Kiaer, J. Gronlund and K. H. Sorensen, *Clin Orthop Relat Res*, 1988, 149-155.
242. E. Mariani, L. Pulsatelli and A. Facchini, *Int J Mol Sci*, 2014, 15, 8667-8698.
243. A. B. Adesida, A. Mulet-Sierra and N. M. Jomha, *Stem Cell Research & Therapy*, 2012, 3, 1-13.
244. C. L. Murphy, B. L. Thoms, R. J. Vaghjiani and J. E. Lafont, *Arthritis Res Ther*, 2009, 11, 213.
245. S. Gao, J. Zhou, Y. Zhao, P. Toselli and W. Li, *Toxicol Sci*, 2013, 132, 379-389.
246. H. Huang, J. Yu, D. Yu, Y. Li and S. Lu, *J Oral Facial Pain Headache*, 2014, 28, 269-276.
247. S. Mazzitelli, M. Borgatti, G. Breveglieri, R. Gambari and C. Nastruzzi, *J Cell Commun Signal*, 2011, 5, 157-165.
248. S. Mazzitelli, L. Capretto, X. L. Zhang, L. Penolazzi, E. Lambertini, R. Piva and C. Nastruzzi, *J Control Release*, 2010, 148, e76-77.
249. T. Kurth, E. Hedbom, N. Shintani, M. Sugimoto, F. H. Chen, M. Haspl, S. Martinovic and E. B. Hunziker, *Osteoarthritis Cartilage*, 2007, 15, 1178-1189.
250. K. Y. Lee and D. J. Mooney, *Prog Polym Sci*, 2012, 37, 106-126.
251. K. Stolz, G. Schulze-Tanzil, H. Olze, S. Schwarz, E. M. Feldmann and N. Rotter, *Cell Tissue Bank*, 2015, 16, 159-170.
252. E. S. Chan, B. B. Lee, P. Ravindra and D. Poncelet, *J Colloid Interface Sci*, 2009, 338, 63-72.
253. J. M. Puguian, X. Yu and H. Kim, *J Colloid Interface Sci*, 2014, 432, 109-116.
254. V. Lefebvre, P. Li and B. de Crombrughe, *EMBO J*, 1998, 17, 5718-5733.
255. B. Rocha, V. Calamia, V. Casas, M. Carrascal, F. J. Blanco and C. Ruiz-Romero, *J Proteome Res*, 2014, 13, 1045-1054.
256. T. N. Wight, *Curr Opin Cell Biol*, 2002, 14, 617-623.
257. Y. Zhang, Y. Wu, L. Cao, V. Lee, L. Chen, Z. Lin, C. Kiani, M. E. Adams and B. B. Yang, *Exp Cell Res*, 2001, 263, 33-42.
258. C. C. Wang, K. C. Yang, K. H. Lin, H. C. Liu and F. H. Lin, *Biomaterials*, 2011, 32, 7118-7126.
259. M. B. Goldring, K. Tsuchimochi and K. Ijiri, *J Cell Biochem*, 2006, 97, 33-44.
260. J. M. Ng, I. Gitlin, A. D. Stroock and G. M. Whitesides, *Electrophoresis*, 2002, 23, 3461-3473.
261. H. Becker and L. E. Locascio, *Talanta*, 2002, 56, 267-287.
262. H. N. Joensson and H. Andersson Svahn, *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51, 12176-12192.
263. K. S. Huang, K. Lu, C. S. Yeh, S. R. Chung, C. H. Lin, C. H. Yang and Y. S. Dong, *J Control Release*, 2009, 137, 15-19.
264. A. Lasagni, D. Yuan, P. Shao and S. Das, 2009.
265. D. Lee, S. N. Beesabathuni and A. Q. Shen, *Biomicrofluidics*, 2015, 9, 064114.
266. A. S. Utada, E. Lorenceau, D. R. Link, P. D. Kaplan, H. A. Stone and D. A. Weitz, *Science*, 2005, 308, 537-541.
267. J. T. Wang, J. Wang and J. J. Han, *Small*, 2011, 7, 1728-1754.
268. W.-L. Chou, P.-Y. Lee, C.-L. Yang, W.-Y. Huang and Y.-S. Lin, *Micromachines*, 2015, 6, 1249.
269. D. Carugo, J. Y. Lee, A. Pora, R. J. Browning, L. Capretto, C. Nastruzzi and E. Stride, *Biomed Microdevices*, 2016, 18, 4.
270. J. H. Luft, *J Biophys Biochem Cytol*, 1961, 9, 409-414.
271. K. G. Helander, *J Microsc*, 1987, 145, 351-355.
272. J. Wu and M. Gu, *J Biomed Opt*, 2011, 16, 080901.
273. P. Garstecki, H. A. Stone and G. M. Whitesides, *Phys Rev Lett*, 2005, 94, 164501.